

**Die Testes spezifische Expression von Bromodomänen-
Proteinen und Untereinheiten des Polycomb-Repressiven-
Komplexes sowie deren mögliche Funktionen während
der Spermatogenese in *Mammalia***

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

Philipps



**Universität
Marburg**

dem Fachbereich Biologie der
Philipps Universität Marburg

vorgelegt von

Nicola Helena Gonzalez, M. Sc.

aus Heidelberg

Marburg/Lahn 2014

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg (Hochschulkennziffer: 1180)
als Dissertation am 30.12.2014 angenommen.

Erstgutachterin: Dr. Christina Rathke

Zweitgutachterin: Prof. Dr. Renate Renkawitz-Pohl

Tag der mündlichen Prüfung am 09.02.2015

Für diejenigen,
die immer an mich geglaubt haben.

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung.....	3
2.1	Aufbau des Testis	3
2.2	Die Spermatogenese	3
2.2.1	Stadien der Spermatogenese in der Maus	6
2.2.2	Stadien der humanen Spermatogenese	8
2.3	Umstrukturierung des Chromatins im Verlauf der Spermiogenese	10
2.3.1	In Testes von <i>Mammalia</i> existieren neben den kanonischen Histonen auch Histonvarianten	10
2.3.2	Dem Histon-Protamin-Wechsel gehen u. a. Histonmodifikationen voraus	10
2.3.3	Beim Histon-Protamin-Wechsel werden Histone zunächst von Transitionsproteinen und dann durch Protaminen ersetzt	11
2.4	Während der Spermatogenese kommt die Transkription fast vollständig zum Erliegen	11
2.5	Bromodomänen-Proteine können an bestimmte posttranslationale Modifikationen von Histonen binden.....	12
2.6	Bildung des basalen Prä-Initiationskomplexes zu Beginn der Transkription	14
2.7	In <i>Drosophila</i> wird ein testisspezifischer TFIID-Komplex postuliert, welcher die Transkription post-meiotisch relevanter Gene aktiviert	16
2.8	<i>Drosophila</i> besitzt testisspezifische Bromodomänen-Proteine die an der Transkriptions-aktivierung beteiligt sein könnten	18
2.9	Klassische Bromodomänen-Proteine in Testes von <i>Mammalia</i>	18
2.10	Der Aufbau der Polycomb-Repressiven-Komplexe 1 und 2 (PRC1/PRC2)	19
2.10.1	Existieren PRC1 und PRC2 in Testes von <i>Mammalia</i> ?	21
3	Zielsetzung	22
4	Material	23
4.1	Gerätschaften.....	23
4.2	Chemikalien.....	23
4.3	Allgemeine Puffer und Lösungen	25
4.4	Molekulare Reagenzien und Kits	25
4.5	Enzyme.....	25
4.6	Synthetische Oligonukleotide (Primer)	26
4.7	Verwendete Spezies.....	28
4.8	Software und Datenbanken	28
4.9	Verwendete Antikörper	28
4.10	Sonstige Materialien	31
5	Methoden	32

5.1	Nukleinsäureanalytik.....	32
5.1.1	Isolierung von gesamt RNA aus murinen Testes.....	32
5.1.2	Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	32
5.1.3	DNase-Verdau.....	33
5.1.4	cDNA-Synthese.....	33
5.1.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	33
5.1.6	Analyse von DNA Fragmente mittels Agarosegelelektrophorese.....	34
5.1.7	Quantitative Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)	35
5.1.8	t-Test zur Berechnung der Signifikanz	35
5.1.9	Sequenzierung.....	36
5.2	Proteinanalytik.....	36
5.2.1	Herstellung von Gesamtproteinextrakt aus murinen Testes	36
5.2.2	Quantitative photometrische Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Bradfoard-Test.....	36
5.2.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE).....	37
5.2.4	Westernblot-Analyse	38
5.3	Histologische Arbeiten.....	39
5.3.1	Präparieren von murinen Testes.....	39
5.3.2	Einbettung muriner Testes	39
5.3.3	Anfertigen von Paraffinschnitten	40
5.3.4	Hämatoxylin-Färbung nach Mayer an Paraffinschnitten.....	40
5.3.5	Immunmarkierung an Paraffinschnitten	41
5.3.6	Klassifizierung der Stadien der murinen Spermatogenese.....	42
5.3.7	Klassifizierung der Stadien der humanen Spermatogenese	42
6	Ergebnisse.....	44
6.1	Die Transkripte der klassischen BRD-Proteine sowie der klassischen PRC1/2-Untereinheiten werden in murinen Testes synthetisiert.....	44
6.2	Analyse juveniler muriner Testes mit unterschiedlicher Keimzellzusammensetzungen.....	45
6.3	Eine Vielzahl an Transkripten der Bromodomänen-Proteine sind in meiotischen und post-meiotischen Keimzellen von Mäusen angereichert	47
6.4	Weitere Transkripte von BRD-Proteinen (<i>Pcaf</i> , <i>Smarca2</i> und <i>Tif1α</i>) sind in murinen Testes signifikant in meiotischen und post-meiotischen Keimzellen angereichert.....	48
6.5	Untersuchung der Proteinexpression der BRD-Proteine und PRC-Untereinheiten mittels Westernblot-Analysen.....	51
6.6	Histologischer Nachweis des zellulären Auftretens der aktiven RNA-Polymerase II CTD-P-S5, H4ac, TNP1, PRM1 und PRM2 in murinen und humanen Testes	52
6.7	In humanen und murinen Testes überschneidet sich die Expression der BRD-Proteine (mBRD2, BRDT, BRD8, mTIF1α) mit dem Auftreten von aktiven RNA-Polymerase II	54

6.8	Die zelluläre Expression von EZH2 ist ähnlich zwischen murinen und humanen Testes	58
6.9	Die Transkripte der PRC Untereinheiten <i>Ring1</i> , <i>Bmi1</i> , <i>Scmh1</i> und <i>Ezh2</i> sind in post-meiotischen Keimzellen signifikant angereichert.....	58
7	Diskussion	60
7.1	Detaillierte histologische Übersicht über das Auftreten der aRNA-Pol II und H4ac im Vergleich zur Expression von TNP1, PRM1 und PRM2	60
7.1.1	Die aRNA-Pol II ist im Säugerhoden sehr konserviert zwischen Mäusen und Menschen	60
7.1.2	H4ac tritt in Mäusen und Menschen in elongierten Spermatiden auf	61
7.1.3	In <i>Mammalia</i> ist TNP1 wie H4ac in elongierten Spermatiden exprimiert	62
7.1.4	PRM1 und PRM2 sind im Säugertestis in späten Spermatiden exprimiert	62
7.2	<i>Brdt</i> ist signifikant in Spermatozyten und runden Spermatiden angereichert und in meiotische sowie post-meiotische Funktionen involviert	63
7.3	Identifizierung einiger BRD-Proteine, die wie BRDT an der Transkription meiotischer sowie post-meiotischer Gene involviert sein könnten	64
7.3.1	<i>Brd1</i> ist in meiotischen und post-meiotischen Keimzellen signifikant angereichert.....	64
7.3.2	mBRD2 könnte wie mBRDT an der Transkription sowie am Histon-Protamin-Wechsel beteiligt sein.....	65
7.3.3	m <i>Brd4</i> ist nicht signifikant in Spermatozyten und runden Spermatiden angereichert	66
7.3.4	m <i>Brd7</i> zeigt die gleiche Transkriptverteilung wie m <i>Brdt</i>	66
7.3.5	BRD8 könnte aufgrund seiner Transkript- und Proteinexpression an der Transkription während der Spermatogenese involviert sein	67
7.3.6	Das Transkript m <i>Brd9</i> ist wie m <i>Brd4</i> nicht signifikant in meiotischen und post-meiotischen Keimzellen angereichert	67
7.3.7	m <i>Pcaf</i> ist wie m <i>Brdt</i> in 16 und 25 dpp-Testis signifikant angereichert	68
7.3.8	mTIF1 α könnte wie mBRDT an der Transkription und Reorganisation des Chromatins involviert sein.....	68
7.4	hBRD3 und hSMARCA2 könnten an der Reorganisation des Chromatins während des Histon-Protamin-Wechsels beteiligt sein.....	69
7.5	Die Expression der Untereinheiten der klassischen BRD-Proteine sowie des PRC1/2 sind mittels Westerblot-Analyse nicht eindeutig identifizierbar	71
7.6	EZH2 und RING1 sind in murinem und humanem Testes exprimiert.....	72
7.6.1	hRING1 könnte an der Kompaktierung des Chromatins im Verlauf des Histon-Protamin-Wechsels beteiligt sein.....	72
7.6.2	hEZH2 könnte wie mEZH2 an der Umstrukturierung des Chromatins beteiligt sein	73
7.7	In Mäusetestes könnten PRC1 und PRC2 an der Repression der Spermatogenesegene im Verlauf der runden Spermatiden beteiligt sein	74
7.8	Ausblick	75
8	Literatur	77
9	Abbildungsverzeichnis	85

10	Abkürzungsverzeichnis	86
11	Anhang.....	88
A	„Binary Decision Key for Staging in the Mouse“ von Meistreich und Hess 2013	88
B	Repräsentative Auswahl an RT-PCRs für Marker von verschiedenen Keimzellen an juveniler muriner Testes.....	89
C	Immunmarkierung an murinen Testes im Alter von 7 dpp, 16 dpp, 25 dpp und 12 Wochen (Adult) mit spezifischen Antikörper gegen AKTIN	90
D	Immunmarkierung gegen BRDT an murinen Testes im Alter von 7 dpp, 16 dpp, 25 dpp	91
12	Erklärung	92
13	Danksagung.....	99

1 Zusammenfassung

Die Spermatogenese ist ein sehr konservierter Prozess von der Fliege bis zu *Mammalia*, bei dem aus diploiden Spermatogonien haploide Spermatiden entstehen. Bei der Spermatogenese von *Mammalia* endet die Transkription in frühen, runden Spermatiden. Die für die Spermiogenese benötigten Transkripte werden translational reprimiert und selektiv bei Bedarf translatiert. In *Drosophila melanogaster* hingegen findet die Transkription translational reprimierter mRNAs bereits in den frühen Spermatozyten statt. Bezüglich des *Drosophila*-Testes gilt die Hypothese, dass u. a. ein testisspezifischer Transkriptionsfaktor TFIID existiert, der die Transkription der post-meiotisch relevanten Gene mit Hilfe von TATA-Box bindende Protein assoziierten Faktoren (tTAFs) initiiert. Weiterhin wird postuliert, dass der Polycomb-Repressive-Komplex 1 (PRC1) die Expression der Spermiogenese-relevanten Gene bis hin zu den frühen Spermatozyten reprimiert. Mit Unterstützung der tTAFs soll der PRC1 vom Promotor dieser Gene entfernt und zum Nukleolus der Spermatozyten rekrutiert werden, wobei die tTAFs zusätzlich auch an der Transkriptionsaktivierung dieser Gene beteiligt sein sollen. Zusätzlich konnten testisspezifisch exprimierte Bromodomänen-Proteine (tBRD-1, tBRD-2, tBRD-3) identifiziert werden, die in *Drosophila*-Testes mit Untereinheiten des PRC1 und den tTAFs in Spermatozyten zu kolokalisieren vermögen. Basierend auf diesen Daten ist die Vermutung aufgestellt worden, dass tBRDs an der Transkriptionsaktivierung in Spermatozyten beteiligt sind. Ob die Reprimierenden Komplexe PRC1 und PRC2 auch in Säuger-Testes vorkommen, ist nicht bekannt. In *Mammalia* ist BRDT das einzig bekannte BRD-Protein, dem eine Rolle bei der Transkriptionsinitiation als auch bei der Reorganisation des Chromatins im Verlauf der Spermatogenese nachgesagt wird.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden klassische BRD-Proteine in Testes von *Mammalia* evaluiert. Die Resultate verweisen darauf, dass die Transkripte für die BRD-Proteine BRD2, BRD8 und TIF1 α in frühen runden Spermatiden signifikant angereichert sind. Zudem überlappt die Expression diese Proteine mit dem Auftreten aktiver RNA-Polymerase II. Die Expression der beiden BRD-Proteine BRD3 und SMARCA2 überlappt mit der des Transitionsproteins 1 sowie mit hyperacetyliertem Histon H4. Die experimentellen Studien legen nahe, dass die genannten BRD-Proteine neben BRDT möglicherweise an der Transkription meiotischer und post-meiotischer Gene (BRD2, BRD8, TIF1 α) sowie an der Reorganisation des Chromatins innerhalb des Histon-Protamin-Austausches (BRD3, SMARCA2) beteiligt sind. Im zweiten Teil der Arbeit wurde untersucht, ob die klassischen Untereinheiten des PRC1 und PRC2 in Säuger-Testes (Maus und Mensch) existieren. Es konnte gezeigt werden, dass die Transkripte der PRC1-Untereinheiten (*Ring1*, *Bmi1*, *Scmh1*, *Cbx2*, *Cbx8*) und des PRC2 (*Ezh2*, *Eed*, *Suz12*) in murinen Testes synthetisiert werden. Die Daten der Transkriptverteilung in Spermatogonien, Spermatozyten und runden Spermatiden erlaubten zudem den Rückschluss, dass der murine PRC1 u. a. aus den Untereinheiten RING1, BMI1 und SCMH1 sowie der PRC2 u. a. aus EZH2, EED und SUZ12 aufgebaut sein könnte. Zudem führt die korrelierende Transkriptverteilung einiger PRC- und BRD-Transkripte zu der Annahme, dass die Neusynthese der PRC-Untereinheiten erforderlich sind für die Repression aller Spermatogenesegene im Verlauf der Spermatidendifferenzierung.

1 Summary

Spermatogenesis is a controlled process in which diploid spermatogonia develop into haploid spermatids. It is also highly conserved among many organisms. In mammalian spermatogenesis, transcription ends in round spermatids. Due to this, transcripts that are required for spermiogenesis have to be transcribed in round spermatids and are translationally repressed until they are needed. In contrast to mammals, transcription of translationally repressed mRNAs takes place in early spermatocytes of *Drosophila melanogaster*. In *Drosophila*, a testis-specific transcription factor TFIID is hypothesized to transcribe post-meiotic relevant mRNAs in association with testis-specific TATA-box binding-protein-associated factors (tTAFs). The Polycomb repressive complex 1 (PRC1) is assumed to be responsible for repressing spermiogenesis-relevant genes until they are transcribed in early spermatocytes. In these cells, PRC1 is supposed to be removed from the promoter of post-meiotic relevant genes by tTAFs and is recruited to the nucleolus. Additionally to the removal of PRC1, it is postulated that tTAFs are involved in transcription activation of these genes. Furthermore, three testis-specific bromodomain proteins (tBRD-1, tBRD-2, tBRD-3) have been identified which partially co-localize with subunits of PRC1 and tTAFs in spermatocytes of *Drosophila*. Based on these findings in *Drosophila*, it has been hypothesized that tBRDs are involved in transcriptional initiation in spermatocytes. It is obscure, whether PRC1 and PRC2 also exist in mammalian testes. So far, BRDT is the only known BRD-protein considered to play a role during transcription initiation and chromatin reorganization throughout spermiogenesis.

The first aim of this study was to evaluate classical BRD-proteins in mammalian testes. The results revealed that the transcripts of *Brd2*, *Brd8* and *Tif1 α* are significantly enriched in round spermatids and that these BRD-proteins are localized in the same germ cells as active RNA-polymerase II is. Two BRD-proteins (BRD3, SMARCA2) showed the same expression pattern as hyperacetylated H4 and transition protein 1. Whereby active RNA-polymerase II served as a marker for transcription. Hyperacetylated H4 as well as transition protein 1 were used to indicate the upcoming histone-to-protamine transition. Summing up these results, in addition to BRDT three further BRD-proteins (BRD2, BRD8 and TIF1 α) were detected that could be involved in transcription of meiotic and post-meiotic relevant genes. Two other BRD-proteins (BRD3, SMARCA2) were found which could play a role during chromatin reorganization throughout histone-to-protamine transition.

The second aim was to analyze if classical subunits of the PRC1 and PRC2 are present in the testes of mice and men. In mice, transcripts of some PRC1-subunits (*Ring1*, *Bmi1*, *Scmh1*, *Cbx2*, and *Cbx8*) and PRC2-subunits (*Ezh2*, *Eed*, *Suz12*) were detected in testes. Due to the transcription pattern of these subunits within different germ cells of mice, it is assumed that the subunits RING1, BMI1 and SCMH1 are part of PRC1 and EZH2, EED and SUZ12 could be part of the PRC2. Since some PRC- and BRD-transcripts are significantly enriched in meiotic and post-meiotic germ cells, it is assumed that PRC1 and PRC2 are newly synthesized in these germ cells in order to repress all spermatogenesis relevant genes and therefore stop transcription during spermatid differentiation.

2 Einleitung

2.1 Aufbau des Testis

Als Testes (Hoden) wird das paarig angelegte innere Geschlechtsorgan bezeichnet, in dem sowohl die Spermatogenese als auch die Steroidgenese stattfindet. Der Testis wird durch Bindegewebssepten in mehrere Hodenlappen (*Lobuli testis*) unterteilt, die alle in das Hodennetz (*Rete testis*) im Zentrum des Hodens münden (siehe Abbildung 1A). Jeder Hodenlappen besteht aus mehreren Keimtubuli (*Tubuli seminiferi*) und dem die Keimtubuli umgebenden Gewebe, das Interstitium. Im Interstitium befinden sich Leydig-Zellen, in denen u. a. das Androgen Testosteron produziert wird. Außerdem enthält es Zellen des Immunsystems, z. B. Makrophagen und Lymphozyten, Blut- und Lymphgefäße sowie Nerven und Fibroblasten. Jeder Keimtubulus ist von einer *Lamina propria* umgeben, welche aus einer basalen Membran, einer Kollagenschicht (nur beim Mensch) und den peritubulären Zellen (Myofibroblasten) besteht (siehe Abbildung 1B). Der Keimtubulus setzt sich zusammen aus dem Keimepithel, in dem die Keimzellen als auch die somatischen Sertoli-Zellen enthalten sind, und einem Lumen, in das die Spermien entlassen werden (siehe Abbildung 1B). Die Sertoli-Zellen befinden sich auf der basalen Membran der Keimtubuli, reichen bis in deren Lumen und dienen als strukturelle Stütze. Die Spermatogenese findet in den Keimtubuli statt. Die daraus resultierenden Spermien werden in das Lumen der Keimtubuli entlassen, gelangen über das *Rete testis* und den *Ductus efferentes* (in Abbildung 1A nicht dargestellt) in die Nebenhoden (Epididymis) (Russell *et al.*, 1990; Weinbauer *et al.*, 2010).

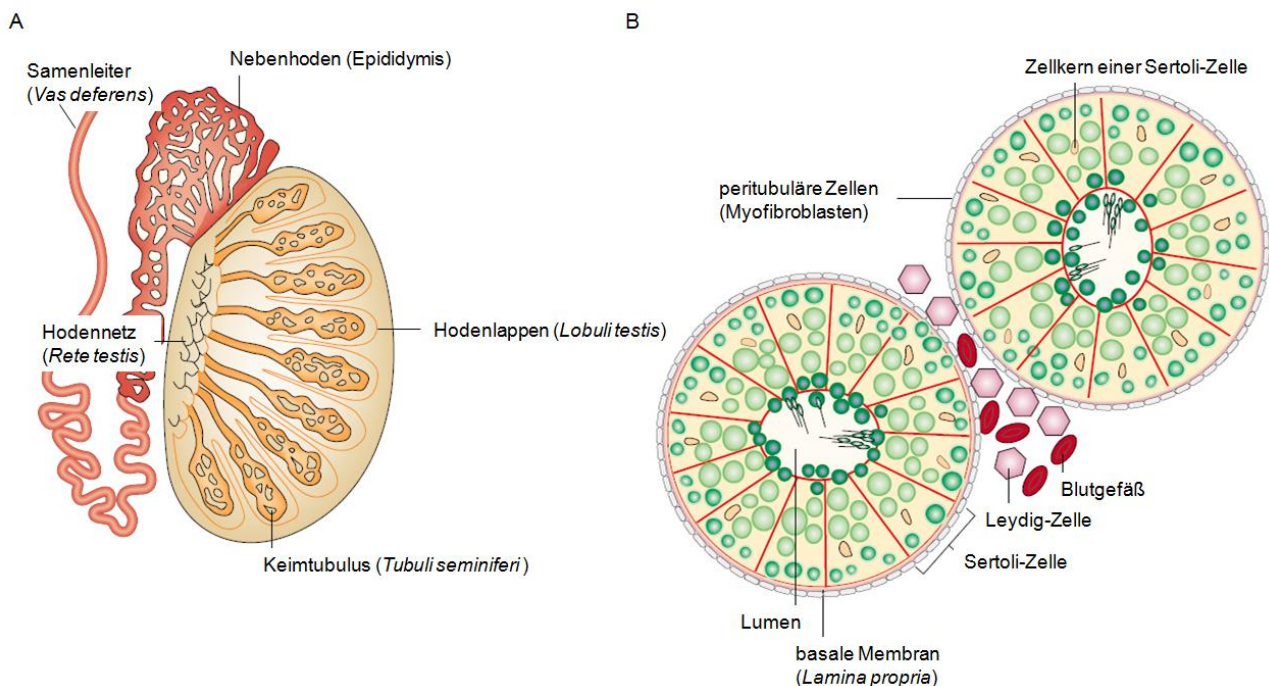


Abbildung 1: Aufbau und Organisation des Testis

(A) Dargestellt ist ein schematischer Querschnitt eines Testis, der die Lokalisation der Hodenlappen, der Keimtubuli, des Nebenhodens, des *Rete testis* und des Samenleiters zeigt. (B) Gezeigt wird ein skizzierter Querschnitt durch einen Keimtubulus. In Grün sind Keimzellen in verschiedenen Entwicklungsstadien dargestellt, deren Entwicklung von der

basalen Membran bis zum Lumen, in das die Spermatozoa abgegeben werden, stattfindet. Während der Entwicklung werden die Keimzellen von Sertoli-Zellen eingebettet (rote eingerahmte Segmente). Die Keimtubuli sind von einer basalen Membran und von peritubulären Zellen umgeben. Zwischen den Keimtubuli befindet sich das Interstitium, das u. a. Blutgefäße und Leydig-Zellen enthält. Modifiziert nach Cooke *et al.*, (2002).

2.2 Die Spermatogenese

Als Spermatogenese wird der Prozess bezeichnet, bei dem sich eine Stammspermatogonie zunächst zur Spermatogonie, dann zur Spermatozyte, weiter zur runden und später zur elongierten Spermatide entwickelt. Diese differenziert schließlich zum Spermatozoon (siehe Abbildung 2). Innerhalb des Keimtubulus besitzen die Keimzellen eine charakteristische Anordnung, die als Stadien der Spermatogenese bezeichnet werden. In Mäusen wird die Spermatogenese in zwölf Stadien unterteilt, während man beim Menschen zwischen sechs Stadien unterscheidet (Clermont, 1963; Russell *et al.*, 1990). Bei der Spermatogenese handelt es sich um einen in vielen Organismen konservierten Prozess, welcher funktional in vier Phasen unterteilt wird:

- A die Proliferationsphase (prä-meiotische Phase), in der die Proliferation und Differenzierung der diploiden Spermatogonien stattfindet (Spermatogoniogenese);
- B die meiotische Phase, in der sich diploide Spermatozyten der Meiose unterziehen und daraus haploide Spermatiden resultieren;
- C die Spermiogenese (post-meiotische Phase), in der sich die Spermatiden zu Spermatozoa entwickeln und
- D die Spermiation (post-meiotische Phase), in der Spermatozoa vom Keimepithel in das Lumen der Keimtubuli entlassen werden (Meistrich *et al.*, 2013; Russell *et al.*, 1990; Weinbauer *et al.*, 2010).

A Die Proliferationsphase

An der basalen Wand des Keimepithels befinden sich diploide Spermatogonien ($2n2C$). In Mäusen unterscheidet man zwischen vier Arten von Spermatogonien: undifferenzierte und differenzierte Typ-A-Spermatogonien, Intermediate (In) und Typ-B-Spermatogonien. In humanen Testes hingegen werden lediglich Typ-A- und Typ-B-Spermatogonien gegenüber gestellt (Meistrich *et al.*, 2013). Die Typ-A-Spermatogonien dienen zum einen dem lebenslangen Erhalt der Spermatogonien (Stamm-Spermatogonien) und sind in der Lage sich mitotisch zu teilen. Durch weitere mitotische Teilung differenzieren sie zu Typ-B-Spermatogonien (Bergmann, 2005). Nach mehreren mitotischen Teilungen der Typ-B-Spermatogonien verläuft die letzte mitotische Teilung unvollständig. Es entstehen interzelluläre Brücken, die nun eine synchrone Reifung der Keimzellen ermöglichen (Alastalo *et al.*, 1998; Bergmann, 2005). Im Anschluss an die letzte mitotische Teilung lösen sich die Typ-B-Spermatogonien von der basalen Wand des Keimepithels ab und treten in die Meiose ein (siehe Abbildung 2).

B Die meiotische Phase

Die meiotische Phase wird durch die mitotische Teilung der Typ-B-Spermatogonien in zwei präleptotäne Spermatozyten (Pl) eingeleitet. Ab diesem Stadium werden die Keimzellen als primäre Spermatozyten bezeichnet. Die Prophase der ersten meiotischen Reifeteilung dauert ca. drei Wochen in der präleptotäne Spermatozyten zu leptotänen (L), zygotänen (Z) und schließlich zu pachytänen (P) Spermatozyten ($2n4C$) ausreifen (Bergmann, 2005; Russell *et al.*, 1990; Weinbauer *et al.*, 2010). Während der Prophase der ersten meiotischen Reifeteilung ändert sich sowohl die Größe der Keimzellen als auch die Morphologie des Nukleus. Alleine die Phase als pachytäne Spermatozyte kann ein bis drei Wochen dauern (Russell *et al.*, 1990). Während dieser Phase finden u. a. chromosomale Rekombinationen und RNA-Synthesen statt, die Keimzelle sowie der Nukleolus vergrößern sich und der Sex-Körper, welches das Sex-Chromatin repräsentiert, wird sichtbar (Russell *et al.*, 1990; Weinbauer *et al.*, 2010). Die pachytänen Spermatozyten differenzieren sich weiter zu diplotänen (D) Spermatozyten. Dieser Typus repräsentiert die größte aller Keimzellen (Russell *et al.*, 1990). Die diplotäne Spermatozyte unterliegt einer ersten meiotischen Reifeteilung (M I), woraus kurzlebige sekundäre Spermatozyten ($1n2C$) resultieren (Russell *et al.*, 1978). Diese unterziehen sich rasch der zweiten meiotischen Reifeteilung (M II), und es entstehen haploide Spermatiden ($1n1C$). Bei Mäusen finden die meiotischen Reifeteilungen im Verlauf der Spermatogenese in Stadium XII, bei Menschen in Stadium VI statt (siehe Abbildung 2).

C Die Spermiogenese

Aus der zweiten meiotischen Reifeteilung entstehen haploide frühe Spermatiden, die auf Grund ihrer rundlichen Form auch als runde Spermatiden bezeichnet werden. Sie sind mitotisch inaktiv, unterziehen sich jedoch einem komplexen Differenzierungsprozess hin zu Spermatozoa. Die Differenzierungsprozesse werden unter dem Begriff Spermiogenese zusammengefasst und beinhalten in erster Linie die Bildung des Spermienkopfes, des Akrosoms, der Geißel und die Abschnürung des überflüssigen Zytoplasmas (Bergmann, 2009; Weinbauer *et al.*, 2010).

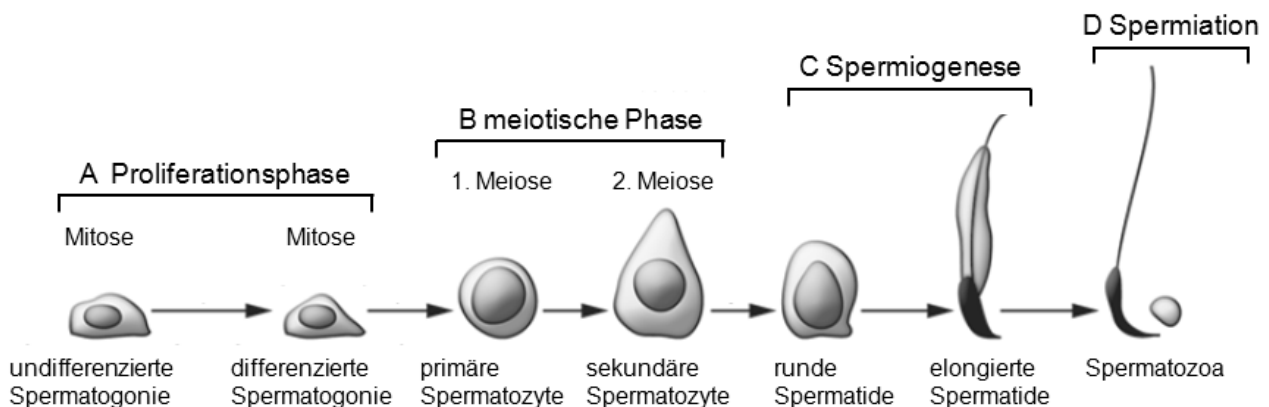


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Spermatogenese in Mäusen

Die Mitose der undifferenzierten Spermatogonien bringt die differenzierten Spermatogonien hervor, die anschließend in die Meiose eintreten (A Proliferationsphase). Mit Beginn der Meiose bezeichnet man die Keimzellen als primäre

Spermatozyten. Sie entwickeln sich von der leptotänen, zygotänen, pachytänen bis hin zu diplotänen Spermatozyten. Letztere treten in die erste Reifeteilung (1. Meiose) ein, es entstehen sekundäre Spermatozyten, die sich wiederum der zweiten Reifeteilung (2. Meiose) unterziehen, mit dem Ergebnis haploider runder Spermatiden (B meiotische Phase). Durch weitere Differenzierungsprozesse entwickeln sich aus runden Spermatiden elongierte Spermatiden (C Spermiogenese) und nachfolgend Spermatozoa, die in das Lumen der Keimtubuli entlassen werden (D Spermiation). Modifiziert nach Hogarth *et al.*, (2010).

Der Spermienkopf entsteht durch die Kondensation des Zellkerns auf nur 10 % seiner ursprünglichen Größe in humanen Testes (Bergmann, 2005). Diese enorme Reduktion des Nukleus wird primär durch den Austausch der DNA assoziierten Histone gegen deutlich kleineren Protamine erreicht. Das Akrosom bildet sich in mehreren Schritten aus dem akrosomalen Bläschen, das sich zuvor an den Zellkern anlagert. Die Geißel wiederum findet ihren Ursprung in zwei Zentriolen, die in „T-Stellung“ zueinander angeordnet sind. Das nicht mehr benötigte Zytoplasma der Spermatiden wird als Residualkörper abgeschnürt und anschließend von den Sertoli-Zellen phagozytiert (siehe Abbildung 2) (Bergmann, 2005; Weinbauer *et al.*, 2010).

D Die Spermiation

Im letzten Schritt der Spermatogenese, der Spermiation, werden die elongierten Spermatiden in das Lumen der Keimtubuli entlassen und fungieren nun als Spermatozoa. Die Spermatozoa gelangen schließlich über den *Rete testis* und den *Ductus efferentes* in den Nebenhoden, ein neuer Spermatogenese-Zyklus kann beginnen (siehe Abbildung 2) (Bergmann, 2005; Weinbauer *et al.*, 2010).

2.2.1 Stadien der Spermatogenese in der Maus

Die murine Spermatogenese wird in zwölf Stadien unterteilt (I - XII), wobei jedes Stadium durch eine spezifische Anordnung der Keimzellen im Keimtubulus charakterisiert ist (siehe Abbildung 3). In der vorliegenden Arbeit wurden die Stadien mit Hilfe des „Binary Decision Key“ nach Meistrich und Hess (2013) klassifiziert (siehe Anhang A), wobei die Stadien I - III, IV - VI, VII - VIII sowie IX - X jeweils in einem Bild der genannten Stadien repräsentiert werden (siehe Abbildung 3A). Die Zuordnung der Spermatiden zum jeweiligen Entwicklungsstadium erfolgt mittels arabischer Zahlen (step 1 bis step 16). Von Stadium I - VIII sind jeweils zwei Spermatiden-Generationen sichtbar, runde und elongierte Spermatiden, ab Stadium IX sind nur noch elongierte Spermatiden vorhanden. Im folgenden Abschnitt wird die Keimzellen-Zusammensetzung jedes Spermatogenese-Stadiums kurz beschrieben:

Stadium I:

Dieses Stadium beinhaltet pachytäne Spermatozyten, runde Spermatiden (step 1) sowie elongierte Spermatiden (step 13). Die runden Spermatiden (step 1) lassen noch keinen akrosomalen Vesikel erkennen (siehe Abbildung 3A, B, I - III).

Stadium II - III:

In diesen Stadien befinden sich die intermediären Spermatogonien, pachytäne Spermatozyten, runde Spermatiden (step 2 - 3) und elongierte Spermatiden (step 13). Im Gegensatz zu Stadium I sind nun in den runden Spermatiden (step 2 - 3) proakrosomale Vesikel sichtbar (siehe Abbildung 3A, B, I - III).

Stadium IV - VI:

Im Stadium IV - VI liegen Typ-B-Spermatogonien, pachytäne Spermatozyten, runde (step 4 - 6) als auch elongierte Spermatiden (step 15) vor. Die Typ-B-Spermatogonien sind an der basalen Membran lokalisiert. Dort unterziehen sie sich mehreren Mitosen, um sich im nächsten Stadium zu präleptotänen Spermatozyten zu differenzieren. Die pachytänen Spermatozyten vergrößern sich zwischen Stadium IV - VI, der Sex-Körper ist zu diesem Zeitpunkt deutlich zu erkennen. Das akrosomale Vesikel der runden Spermatiden (step 4 - 6) beginnt sich abzuflachen und wird länger. Die elongierten Spermatiden (step 15) migrieren langsam zum Lumen des Keimtubulus (siehe Abbildung 3A, B, IV - VI).

Stadium VII - VIII:

Charakterisiert werden diese Stadien durch das Auftreten von präleptotänen und pachytänen Spermatozyten einschließlich runder (step 7 - 8) sowie elongierter Spermatiden (step 16). An der basalen Membran befinden sich die aus den Typ-B-Spermatogonien hervorgegangenen präleptotänen Spermatozyten. In den pachytänen Spermatozyten sind neben dem Sex-Körper nun auch der Golgi-Apparat im Nukleus deutlich zu erkennen. Das Akrosom der runden Spermatiden (step 7 - 8) entwickelt sich weiter. Die elongierten Spermatiden (step 16) befinden sich mittlerweile aufgereiht am Lumenrand und werden als Spermatozoa in das Lumen entlassen. Das überschüssige Zytoplasma der elongierten Spermatiden (step 16) wird abgeschnürt und ist als Residualkörper sichtbar (siehe Abbildung 3A, B, VII - VIII).

Stadium IX - X:

In Stadium IX - X dominieren leptotäne und pachytäne Spermatozyten als auch elongierte Spermatiden (step 9 - 10). Die Transition des Nukleus von rund zu länglich ist in den elongierten Spermatiden (step 9 - 10) deutlich zu erkennen. Die verbliebenen Residualkörper der ins Lumen entlassenen elongierten Spermatiden (step 16) aus Stadium VIII, werden von den Sertoli-Zellen phagozytiert (siehe Abbildung 3, A, B, IX - X).

Stadium XI:

Hier liegen zygotäne sowie diplotäne Spermatozyten als auch elongierte Spermatiden vor (step 11). Die Nuklei der step 11-Spermatiden werden dünner und elongieren (siehe Abbildung 3A, B, XI).

Stadium XII:

In Stadium XII sind zygotäne Spermatozyten sowie primäre Spermatozyten in verschiedenen Phasen der

ersten oder zweiten Reifeteilung (Metaphase, Anaphase, Telophase), sekundäre Spermatozyten und step 12-Spermatiden enthalten. Step 12-Spermatiden haben deutlich schlankere Nuklei im Vergleich zu step 11-Spermatiden (siehe Abbildung 3A, B, XII) (Hess *et al.*, 2008; Russell *et al.*, 1990). Die gesamte Dauer der murinen Spermatogenese beträgt ca. 39 – 40 Tage (França *et al.*, 1998; Hess *et al.*, 2008; Russell *et al.*, 1990).

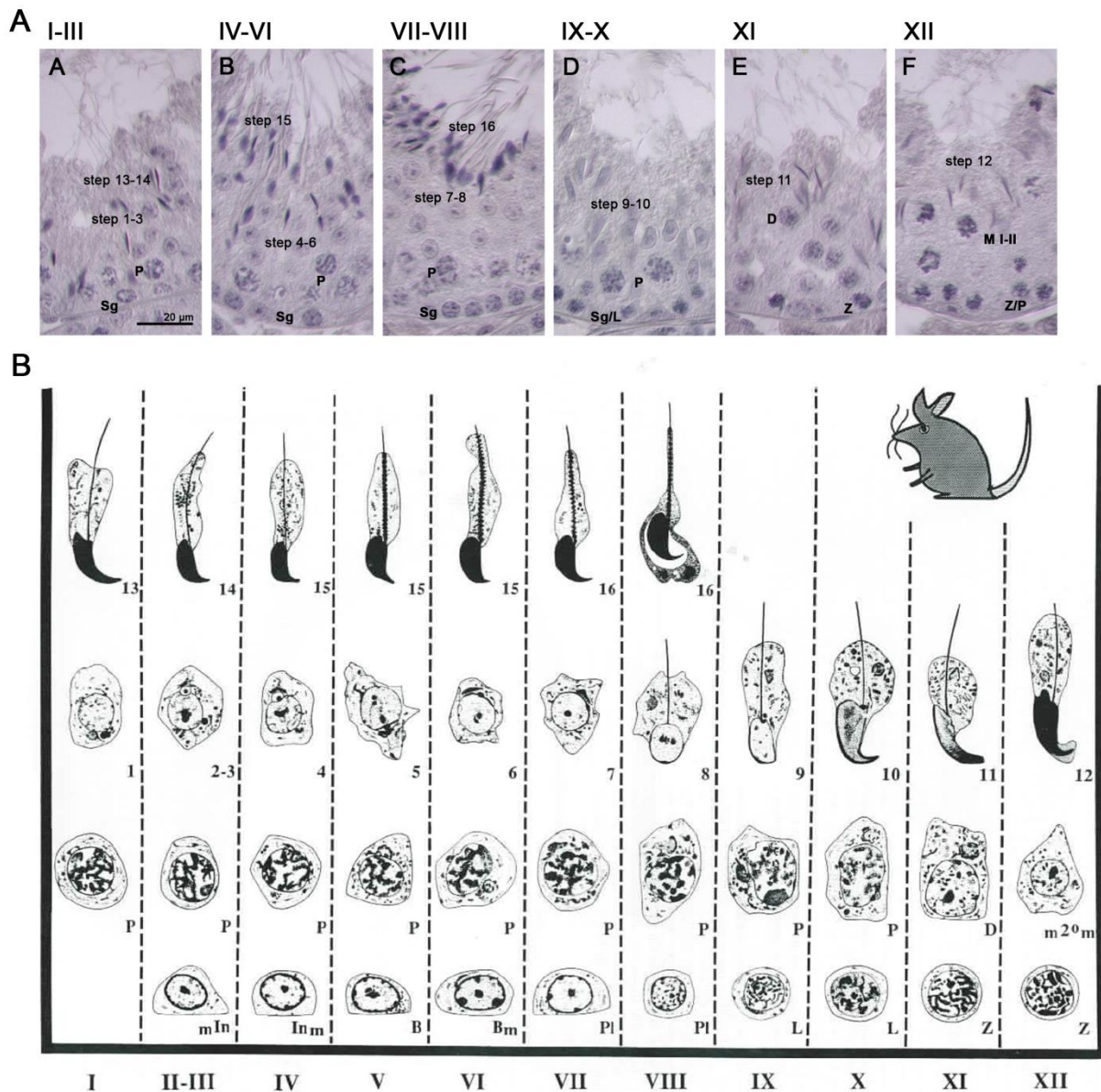


Abbildung 3: Stadien der murinen Spermatogenese

(A) Testikuläre Paraffinschnitte adulter, zwölf Wochen alter Mäuse, die nach dem „Binary Decision Key“ von Meistreich und Hess 2013 klassifiziert wurden. Die Präparate wurden in BOUINScher Lösung (Bouin) fixiert und die Zellkerne mit Hämatoxylin blau-violett gefärbt. Die römischen Ziffern (I - XII) repräsentieren die Stadien der Spermatogenese, die arabischen Ziffern (step 1 - 16) das Entwicklungsstadium der Spermatiden. Jedes Spermatogenese-Stadium ist durch eine spezifische Anordnung der Keimzellen charakterisiert. Die Stadien I - III, IV - VI, VII - VIII sowie IX - X wurden jeweils in einem Bild zusammengefasst. (B) Schematische Darstellung der XII Spermatogenese-Stadien nach Russell *et al.*, (1990). In jedem Stadium sind die darin enthaltenen Keimzellen dargestellt: Spermatogonien (Sg), intermediate Spermatogonien (mIN/INm), Typ-B-Spermatogonien (B/Bm), präleptotäne Spermatozyten (Pl), leptotäne Spermatozyten (L), zygoten Spermatozyten (Z), pachytäne Spermatozyten (P), diplotäne Spermatozyten (D), sekundäre Spermatozyten (M I-II/m²m), Spermatiden (step 1 - 16).

2.2.2 Stadien der humanen Spermatogenese

Die humane Spermatogenese wird nach Clermont (1963) in sechs Stadien unterteilt. Im Vergleich zur Mausspermatogenese, in der immer nur ein Stadium je Tubulusquerschnitt zu sehen ist, besitzt das humane Keimepithel mehrere Stadien je Tubulusquerschnitt („multi-stage-arrangement“), d. h. es laufen mehrere Spermatogenesewellen gleichzeitig im Keimtubulus ab (Bergmann, 2005; Bergmann, 2009). In der vorliegenden Arbeit werden die Stadien I und II jeweils in einem Bild zusammengefasst. Das Stadium VI ist nur von kurzer Dauer und daher in vielen Präparaten nicht vorhanden (siehe Abbildung 4B). Auch in humanen Testes ist jedes Stadium durch eine charakteristische Anordnung an Keimzellen gekennzeichnet:

Stadium I - II:

In diesen Stadien sind Typ-A- und Typ-B-Spermatogonien, pachytäne Spermatozyten sowie runde (step 1 - 2) und elongierte Spermatiden (step 7 - 8) vorhanden. Ab Stadium II sind die Residualkörper der step 8-Spermatiden sichtbar. Im Anschluss findet die Spermiation der step 8-Spermatiden statt (siehe Abbildung 4A, B, I - II).

Stadium III:

Stadium III definiert sich über die Präsenz von Typ-A-Spermatogonien, präleptotäner sowie pachytäner Spermatozyten und runder Spermatiden (step 3). Die Nuklei der runden Spermatiden (step 3) beginnen langsam zu kondensieren (siehe Abbildung 4A, B, III).

Stadium IV:

Neben Typ-A-Spermatogonien liegen leptotäne und pachytäne Spermatozyten sowie step 4-Spermatiden vor. Die Nuklei der step 4-Spermatiden sind deutlich kondensierter im Vergleich zu step 3-Spermatiden (siehe Abbildung 4A, B, IV).

Stadium V:

Auffallend ist die Präsenz von Typ-A-Spermatogonien, zygotänen und pachytänen Spermatozyten sowie step 5-Spermatiden. Das Stadium V ist dem Stadium IV sehr ähnlich. Die step 5-Spermatiden sind jedoch deutlich kondensierter und elongierter, verglichen mit den step 4-Spermatiden (siehe Abbildung 4A, B, V).

Stadium VI:

Stadium VI rundet die Spermatogenese ab und beinhaltet Typ-A-Spermatogonien, zygotäne Spermatozyten, Spermatozyten in erster oder zweiter Reifeteilung sowie step 6-Spermatiden (siehe Abbildung 4B, VI). Wie bereits erwähnt, ist dieses Stadium nur von kurzer Dauer und selten in histologischen Schnitten zu finden (Bergmann, 2005; Bergmann, 2009).

Die humane Spermatogenese dauert insgesamt ca. 74 Tage (Heller *et al.*, 1964). Hinzuzurechnen sind weitere zwölf Tage, während derer die Spermatozoa die Nebenhoden passieren. Bis die Spermatogonie als Spermatozoon im Ejakulat auftritt, vergehen somit ca. 86 Tage (Bergmann, 2009).

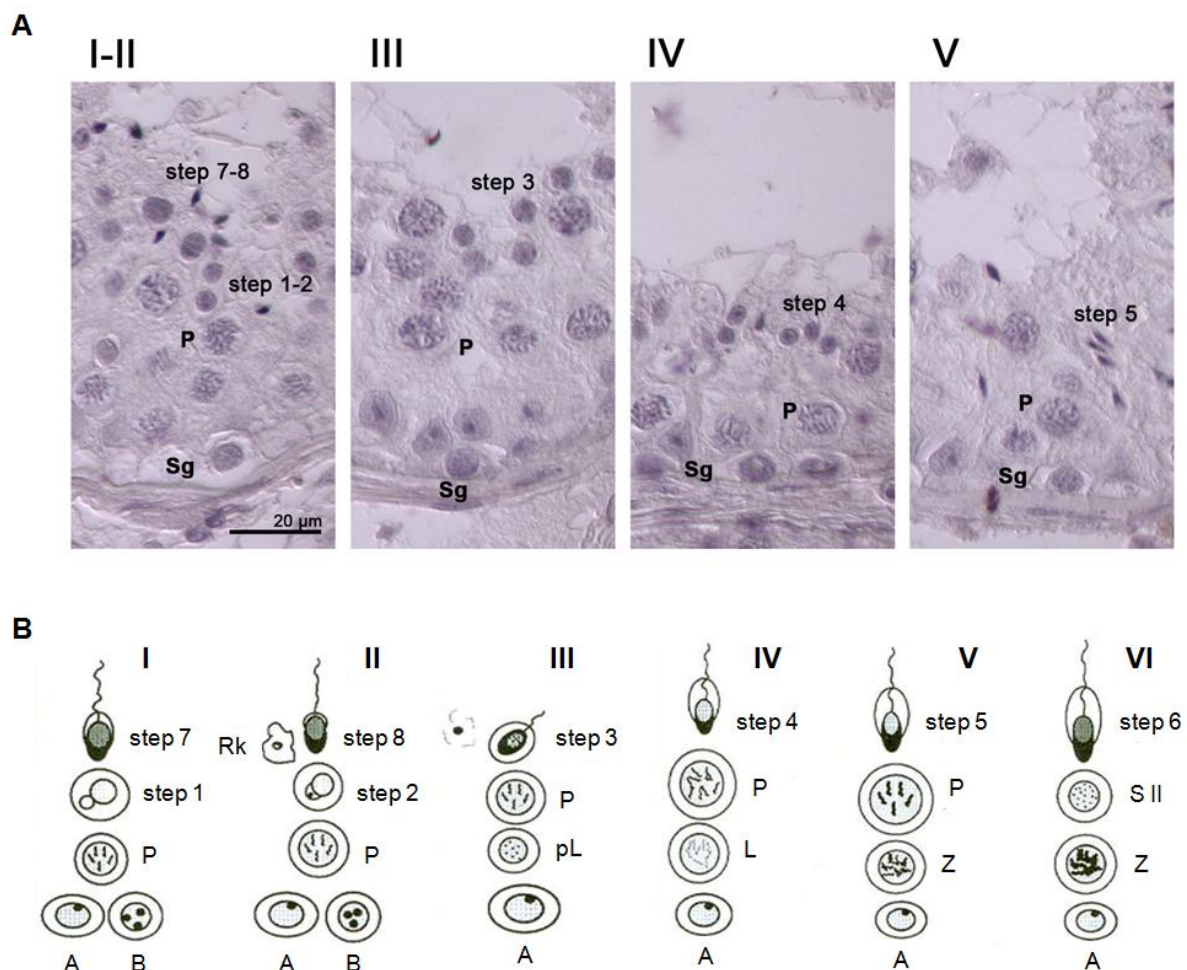


Abbildung 4: Die sechs Stadien der humanen Spermatogenese

(A) Bouin fixierte Paraffinschnitte von humanen Testes mit normaler Spermatogenese. Dargestellt sind die Stadien I - V. Um die Stadien besser klassifizieren zu können, wurden die Nuklei mit Hämatoxylin blau-violett gefärbt. (B) Schematische Übersicht über die Keimzellenanordnung der Stadien (I - VI). Spermatogonien (Sg), Typ-A-Spermatogonien (A), Typ-B-Spermatogonien (B), präleptotäne Spermatozyten (pL), leptotäne Spermatozyten (L), zygoten Spermatozyten (Z), pachytäne Spermatozyten (P), sekundäre Spermatozyten (S II), Spermatiden (step 1 – 8), Residualkörper (Rk). Modifiziert nach Bergmann (2009).

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten humanen Testispräparate wurden aus entnommenen Hodenbiopsien gewonnen. Während der Gewebsentnahme konnten Quetschungen auftreten, mit der Gefahr einer möglichen Ablösung einzelner Keimzellen von der Membran. Um eine Falschbeurteilung auszuschließen wurden daher zur Stadienklassifizierung nur die Keimzellen beachtet, die mit dem Keimepithel an der basalen Membran fest verbunden waren, während lose Keimzellen im Lumen des Keimtubulus nicht berücksichtigt wurden. Eine normale Spermatogenese lag dann vor wenn in der histologischen Untersuchung der Hodenbiopsie im Großteil der Keimtubuli mindestens eines der sechs Spermatogenesestadien zu erkennen war (Bergmann, 2009).

2.3 Umstrukturierung des Chromatins im Verlauf der Spermiogenese

In der post-meiotischen Phase der Spermatogenese (Spermiogenese) finden distinkte morphologische Veränderungen in den haploiden Spermatiden statt. Zu diesen morphologischen Veränderungen zählen insbesondere die Kompaktierung und Restrukturierung des Chromatins. In den meisten eukaryotischen Zellen ist die DNA mit Nukleosomen assoziiert. Die Nukleosomen sind wiederum aus Histonoktameren aufgebaut, die aus je zwei kanonischen Histonen H2A, H2B, H3 und H4 bestehen. Das Linker Histon H1 verbindet die einzelnen DNA-assoziierten Nukleosomen miteinander (Kowalski *et al.*, 2012; Rathke *et al.*, 2014; Talbert *et al.*, 2010). Im Verlauf der Kompaktierung und Reorganisation des Chromatins kommt es u. a. zum Austausch der kanonischen Histone der Nukleosomen. Die Histone werden vorübergehend von Transitionsproteinen und im Anschluss durch die Protamine ersetzt (Dadoune, 2003; Steger, 1999). Dieser Vorgang wird auch als Histon-Protamin-Austausch bzw. -Wechsel bezeichnet.

2.3.1 In Testes von *Mammalia* existieren neben den kanonischen Histonen auch Histonvarianten

Die kanonischen Histone sind überwiegend für die Kompaktierung des Genoms als auch für die Genregulation zuständig. In Säugern existieren Histonvarianten zu dem der kanonischen Histone H2A, H2B, H3 und dem Linker-Histon H1. Diese Varianten werden auch als nicht-kanonische Histone bezeichnet (Bönisch *et al.*, 2012; Faast *et al.*, 2001; Malik *et al.*, 2003; Rathke *et al.*, 2014). Funktional sind sie an einer Vielzahl von Prozessen beteiligt, z. B. an der Transkriptionsinitiation oder der Reparatur von DNA (Clarkson *et al.*, 1999; Rathke *et al.*, 2014). Der Säugertestes verfügt zusätzlich über testisspezifische Histonvarianten (Unni *et al.*, 1995; Van Rooijen *et al.*, 1998). Im Rahmen des Histon-Protamin-Wechsels werden kanonische Histone gegen Histonvarianten ausgetauscht. Varianten des Histons-H2A, H2A.X und H2A.Z sind in *Mammalia* bis zur Restrukturierung des Chromatins detektierbar (Greaves *et al.*, 2006; Leduc *et al.*, 2008). Die testisspezifische Histon-H1-Variante H1T2 ist in Mäusen in haploiden Spermatiden bis zum Zeitpunkt des Histon-Protamin-Wechsels exprimiert (Martianov *et al.*, 2005; Tanaka *et al.*, 2005). Des Weiteren sind TH2A und TH2B (testisspezifischen Histon-H2A- und H2B-Varianten) in post-meiotischen Spermatiden detektierbar (Unni *et al.*, 1995; Van Rooijen *et al.*, 1998), jedoch nicht mehr mit fortschreitender Chromatinkompaktierung (Kim *et al.*, 1987; Tanphaichitr *et al.*, 1978; Trostle-Weige *et al.*, 1982).

2.3.2 Dem Histon-Protamin-Wechsel gehen u. a. Histonmodifikationen voraus

In *Mammalia* dienen spezifische Histonmodifikationen, sowie DNA-Strangbrüche als Indikator für den Histon-Protamin-Wechsel (McPherson *et al.*, 1992). In Mäusen und Menschen konnte diesbezüglich eine Hyperacetylierung des Histons H4 (H4ac) im Nukleus elongierter Spermatiden kurz vor dem Histon-Protamin-Wechsel beobachtet werden (Grimes Jr *et al.*, 1984; Sonnack *et al.*, 2002). Es wurde entsprechend postuliert, dass die H4ac der Öffnung der Chromatinstruktur für den Histon-Protamin-Wechsel dient da

z. B. H4ac erst im Nukleus von Spermatiden auftritt wenn die aktive RNA-Polymerase II nicht mehr detektierbar ist (Dottermusch-Heidel *et al.*, 2014b). In Säugern wurde die H3K79-Methylierung als ein weiteres Merkmal elongierter Spermatiden vor dem Histon-Protamin-Wechsel identifiziert (Dottermusch-Heidel *et al.*, 2014a; Dottermusch-Heidel *et al.*, 2014b). Zudem sind weitere Histonmodifikationen elongierter Spermatiden bekannt: in Mäusen die Acetylierung von H3K9, H4K5, H4K8 und H4K12 (Moriniere *et al.*, 2009; Song *et al.*, 2011; Steilmann *et al.*, 2011; Van der Heijden *et al.*, 2006) sowie in Menschen die Acetylierung von H3K9, H4K8 und H4K16 (De Vries *et al.*, 2012; Song *et al.*, 2011; Steilmann *et al.*, 2011). Weitere bekannte Modifikationen in *Mammalia* sind die Mono-, Di-, und Trimethylierung von H3K4 sowie die Di-, und Trimethylierung von H3K27, welche auch mit der Repression des Chromatins in Verbindung gebracht werden (De Vries *et al.*, 2012; Godmann *et al.*, 2007). Zusätzlich zu der Acetylierung und Methylierung könnte auch die Mono-Ubiquitinylierung entscheidend für den korrekten Ablauf der Spermiogenese sein, da die mono-ubiquitinylierten Histone H2A und H2B während der murinen Meiose als auch in elongierten Spermatiden angereichert sind (Baarends *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 1998).

2.3.3 Beim Histon-Protamin-Wechsel werden Histone zunächst von Transitionsproteinen und dann durch Protaminen ersetzt

Beim Histon-Protamin-Wechsel werden vorübergehend 90 % des Chromatins in *Mammalia* durch Transitionsprotein 1 (TNP1) und Transitionsprotein 2 (TNP2), ersetzt (Meistrich *et al.*, 2003). Versuche an *Tnp1* „Knockout“-Mäusen haben gezeigt, dass die Motilität der Spermien deutlich beeinträchtigt ist und die Menge an TNP2 sowie von Vorstufen des Proteins Protamin 2 (PRM2) deutlich ansteigt, verglichen zu den Kontrolltieren. Es wird vermutet, dass diese Zunahmen in der Kompensation des TNP1-Verlusts begründet liegt. Des Weiteren sind 60 % der murinen *Tnp1* „Knockout“-Männchen steril (Balhorn, 2007; Rathke *et al.*, 2014). Murine *Tnp1*- und *Tnp2*-Doppelmutanten sind ebenfalls steril, weisen jedoch einen intakten Histon-Protamin-Wechsel auf. Dennoch traten Defekte in der Chromatin-Kondensierung und Veränderungen in den DNA-Strang Brüche auf sowie eine reduzierte Spermatozoa-Anzahl (Zhao *et al.*, 2004a; Zhao *et al.*, 2004b). Im weiteren Verlauf der Spermatidendifferenzierung weichen die Transitionsproteine den Protaminen. In den Maus-Spermatozoa werden 99 % der Histone durch Protamin 1 (PRM1) und Protamin 2 (PRM2) ersetzt, während es beim Mensch nur 85 % sind (Brunner *et al.*, 2014). PRM1 und PMR2 sind essentiell für die murine Fertilität, da Cho *et al.*, (2001) zeigen, dass die Mutation in einem der Allele von *Prm1* oder *Prm2* zur Haploinsuffizienz und somit zu Sterilität führt.

2.4 Während der Spermatogenese kommt die Transkription fast vollständig zum Erliegen

Bei der Spermatogenese handelt es sich um einen zwischen vielen Organismen hoch konservierten Prozess. Eine Besonderheit der Transkription der Säugerspermatogenese ist, dass diese im Verlauf der Spermiogenese fast vollständig zum Erliegen kommt (Kierszenbaum *et al.*, 1975; Monesi, 1965; Utakoji, 1966).

Das heißt, es gibt ein hohes Maß an Transkriptionsaktivität in den Spermatogonien bis in den frühen runden Spermatiden. Mit der fortschreitenden Differenzierung wird die Transkription supprimiert (Kierszenbaum et al., 1975) (siehe Abbildung 5, oben). Da somit die DNA-Transkription in der post-meiotischen Phase geblockt ist, müssen konsequenterweise die post-meiotisch benötigten Transkripte für Proteine wie TNP1, TNP2, PRM1 und PRM2 bereits in den runden Spermatiden synthetisiert und bis zum Gebrauch translational reprimiert worden sein (Steger, 1999) (siehe Abbildung 5, oben).

Auch in der *Drosophila*-Spermatogenese kommt die Transkription nahezu zum Erliegen und zwar schon vergleichsweise früh in den primären Spermatozyten. Die mRNAs für die in den nachfolgenden Schritten benötigten Proteine müssen daher schon in den Spermatozyten für die spätere Spermiogenese bereit gestellt werden (Jayaramaiah-Raja et al., 2005; Renkawitz-Pohl et al., 2005) (siehe Abbildung 5, unten).

Diese reprimierten Transkripte von *Drosophila* und *Mammalia* sind über mehrere Tage stabil (Schafer et al., 1995; Steger, 2001). In *Mammalia* wird die translationale Repression der post-meiotisch relevanten mRNAs u. a. über die 5'- und 3' UTR vermittelt (Schafer et al., 1995; Steger, 1999), in *Drosophila* hauptsächlich über die 5' UTR. Darüber hinaus konnte für *Drosophila* belegt werden, dass Sequenzen innerhalb des offenen Leserahmens u. a. an der translationalen Repression post-meiotischer mRNAs beteiligt sein könnten (Barckmann et al., 2013; Schafer et al., 1995)

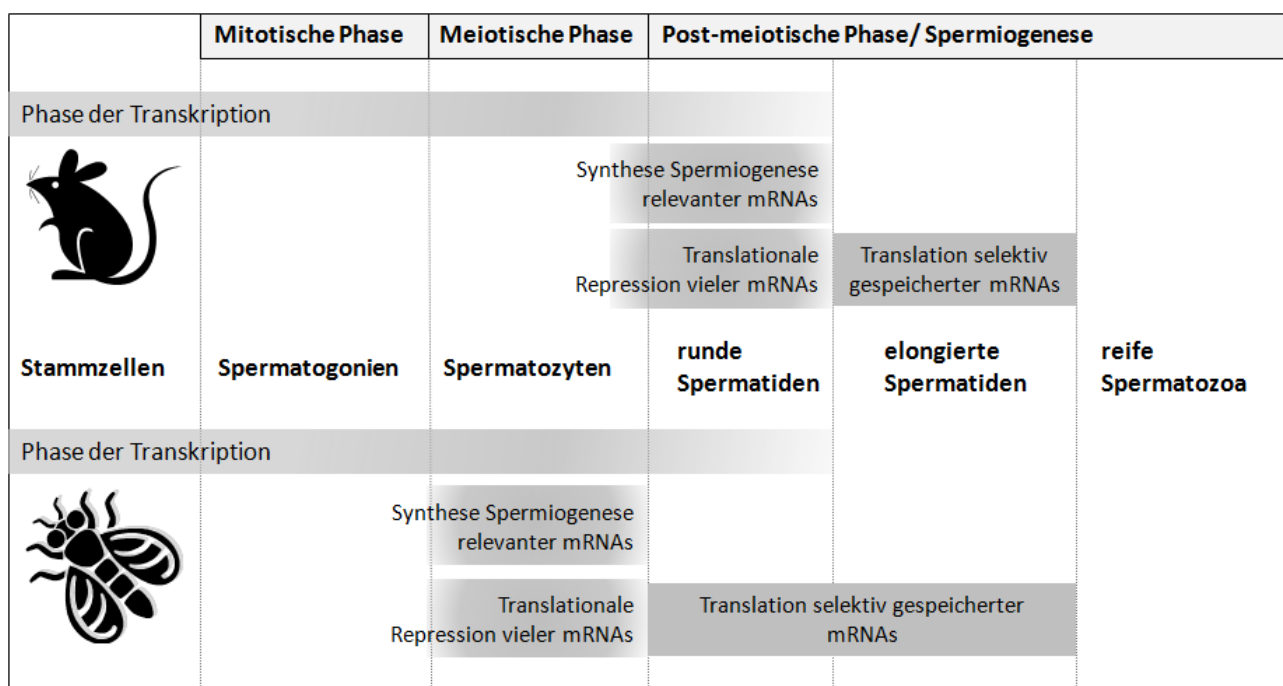


Abbildung 5: Vergleich der Spermatogenese zwischen Mäusen und *Drosophila*

Schematische Darstellung der verschiedenen Prozesse innerhalb der Spermatogenese. Die Spermatogenese wurde hier in drei Stufen unterteilt: in die mitotische, meiotische und post-meiotische Phase/Spermiogenese. (Oben) Die allgemeine Transkription findet in Mäusen noch bis hin zu den frühen runden Spermatiden statt und kommt dann langsam zum Erliegen. In den runden Spermatiden werden die Gene für die Spermiogenese transkribiert, die mRNA translational reprimiert und in den elongierten Spermatiden bei Bedarf selektiv translatiert. (Unten) In *Drosophila* verhält sich dieser Prozess analog zu dem in Mäusen, mit dem Unterschied, dass in *Drosophila* die Transkription bereits in den Spermatozyten zum Erliegen kommt. Modifiziert nach Rathke et al., (2014).

2.5 Bromodomänen-Proteine können an bestimmte posttranslationale Modifikationen von Histonen binden

Posttranslationale Modifikationen (PTMs) von Histonen haben einen entscheidenden Einfluss auf die Transkriptionsregulation von Genen. Ein Großteil der bisher untersuchten PTMs sind an den N-terminalen Histon-Schwänzen zu finden, welche aus den Nukleosomen heraustreten (Filippakopoulos *et al.*, 2012; Luger *et al.*, 1997). Zu den PTMs zählen u. a. Acetylierung, Methylierung und Phosphorylierung (Kouzarides, 2007; Turner, 2005). In jüngster Zeit sind noch weitere PTMs entdeckt worden, wie die Crotonylierungen von Histonen (Tan *et al.*, 2011). Jede dieser PTMs kann die Struktur des Chromatins verändern. Entscheidend für die Chromatinstruktur ist die Gesamtheit aller PTM-Prozesse (Filippakopoulos *et al.*, 2012).

Die Öffnung des Chromatins ist die Voraussetzung für die Transkription und den Histon-Protamin-Wechsel. Vermittelt wird diese vor allem durch Methylierungen, Phosphorylierungen und Acetylierungen der Nukleosomen (Florence *et al.*, 2001) z. B. die Hyperacetylierung von Histon H4 (Braun, 2001; Moriniere *et al.*, 2009). Generell korrelieren die ϵ -N-Acetylierungen von Lysin-Seitenketten (Kac) mit offenem Chromatin und werden so mit der Transkriptionsaktivierung in Verbindung gebracht (Marushige, 1976). Erkannt werden ϵ -N-acetylierte Lysin-Seitenketten von Bromodomänen (BD). Deren Aufbau ist stark konserviert. Sie bestehen aus ca. 110 Aminosäuren, die strukturell vier α -Helices (αZ , αA , αB , αC) ergeben, wobei jeweils αZ mit αA sowie αB mit αC über einen Loop verbunden sind (Filippakopoulos *et al.*, 2012).

Zu den klassischen Bromodomänen-Proteinen (BRD-Proteine) zählen u. a.: BRD1, BRD2, BRD3, BRD4, BRDT, BRD7, BRD8 und BRD9, wobei in Mäusen und Menschen die Proteine BRD2, BRD3, BRD4 und BRDT zur Familie der BET-Proteine zusammengefasst werden (siehe Tabelle 1). Auch Transkriptionsfaktoren können BDs besitzen, z. B. besitzt TAF1 zwei BDs (Luger *et al.*, 1997).

Die Familie der tierischen BET-Proteine („bromodomain and extraterminal domain“) ist charakterisiert durch zwei Bromodomänen, ein verlängertes Kernlokalisierungssignal (NLS) und eine ET-Domäne, welche aus einer NET-Domäne, einer dazwischen liegenden Sequenz und einem SEED-Motiv aufgebaut ist (Florence *et al.*, 2001). Pflanzliche BET-Proteine besitzen nur eine BD und nur manchmal ein SEED-Motiv (Florence *et al.*, 2001). Über die ET-Domäne können die BRD-Proteine mit anderen Proteinen interagieren (Choudhary *et al.*, 2009; Kouzarides, 2000; Zhao *et al.*, 2010).

Aufgrund der BD sowie ET-Domäne der BET-Proteine wird vermutet, dass BET-Proteine Chromatin-regulierende Komplexe an das Chromatin binden bzw. dahin rekrutieren (Florence *et al.*, 2001) und somit an der Transkriptionsinitiation beteiligt sind.

Tabelle 1: Übersicht über die klassischen BRD-Proteine mit ihrer beschriebenen humanen Funktion*(N) nukleäre Lokalisation; (Z) zytoplasmatische Lokalisation. Modifiziert nach Filippakopoulos *et al.*, (2012b)

Protein	Name	Alias	Funktion	Subzelluläre Lokalisation*	UniProt ID	Quelle
BRD1	Bromodomain-containing protein 1	BRL, BRPF2	Transkriptionsregulator oder Gerüst-/Stützprotein	N, Z	O95696	(Ullah <i>et al.</i> , 2008)
BRD2	Bromodomain-containing protein 2	FSH, RING3	Transkriptionsregulator	N	P25440	(LeRoy <i>et al.</i> , 2008)
BRD3	Bromodomain-containing protein 3	ORFX, RING3L	Transkriptionsregulator	N	Q15059	(LeRoy <i>et al.</i> , 2008)
BRD4	Bromodomain-containing protein 4	CAP, MCAP, HUNK1	Transkriptionsregulator	N	O60885	(Yang <i>et al.</i> , 2008)
BRDT	Bromodomain-containing protein, testis specific	BRD6	Chromatinremodelierungsfaktor	N	Q58F21	(Morinire <i>et al.</i> , 2009)
BRD7	Bromodomain-containing protein 7	BP75, NAG4, CELTIX1	Transkriptionsregulator	N	Q9NPI1	(Kaeser <i>et al.</i> , 2008)
BRD8B	Bromodomain-containing protein 8 B	SMAP, SMAP2	Transkriptionsregulator	N	Q9H0E9-2	(Cai <i>et al.</i> , 2003)
BRD9	Bromodomain-containing protein 9	-	Unbekannt	N, Z	Q9H8M2	-

2.6 Bildung des basalen Prä-Initiationskomplexes zu Beginn der Transkription

Der Transkriptionsprozess lässt sich in drei Schritte unterteilen: die Transkriptionsinitiation, die Transkriptionselongation und die Termination der Transkription. Die Initiation erfolgt u. a. über basale Prä-Initiationskomplexe (PIK), deren Zusammensetzung sich je nach Gewebe und Zelltyp unterscheiden kann (Thomas *et al.*, 2006). Zu Beginn wird der basale Prä-Initiationskomplex am Promoter benötigt, der bei Eukaryoten über min. sieben Kernpromotorelemente für die Formation des PIKs verfügt (Thomas *et al.*, 2006). Zu diesen Kernpromotorelementen zählen z. B. die „TATA-Box“ (TATA), der Initiator (Inr), das „downstream promoter element“ (DPE) (Burke *et al.*, 1997) und das „downstream core element“ (DCE) (Lee *et al.*, 2005). Es gibt viele verschiedene Modelle die, die Zusammensetzung des PIK beschreiben (Sikorski *et al.*, 2009). Ein Model für die Bildung des PIKs wird über den Transkriptionsfaktor TFIID vermittelt. TFIID ist ein Multiproteinkomplex, aufgebaut aus dem TATA-Box bindenden Protein TBP sowie ~13 TBP assoziierten Faktoren (TAFs). TAFs können promotor- als auch gewebespezifisch sein. Spekulativ bindet TFIID mittels TBP an die TATA-Box des Promotors. Durch die Bindung weiterer TFs (z. B. TFIIA, TFIIB, TFIIE, TFIIF und TFIIH) wird die Interaktion des TFIID mit dem Promotor stabilisiert, so dass die RNA-Polymerase II sich besser niederlassen kann. Mittels der Assoziation der RNA-Polymerase II mit TFs wird dieser zum Promotor rekrutiert. Damit ist der basale Prä-Initiationskomplex vollständig und die Transkription kann beginnen (Thomas *et al.*, 2006) (siehe Abbildung 6).

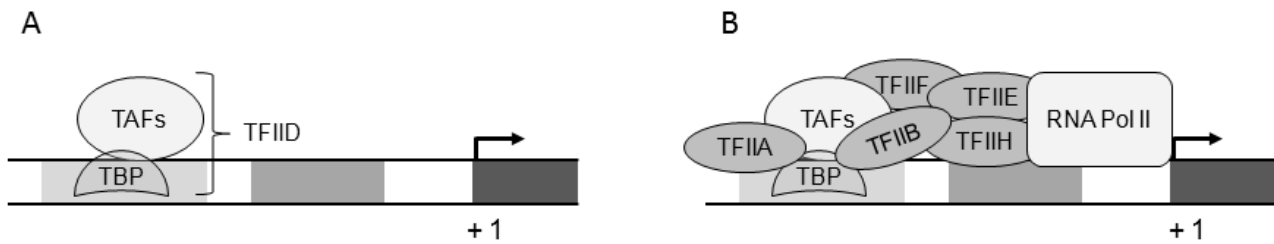


Abbildung 6: Model der TFIID initiierten Bildung des basalen Prä-Initiationskomplexes der RNA-Polymerase II

Als Balken ist der Promotor inklusive verschiedener Kernpromotorelemente (verschiedene graue Schattierungen) dargestellt. Die ovalen Formen repräsentieren die verschiedenen Transkriptionsfaktoren (TFIIA - TFIIF) und das Rechteck die RNA-Polymerase II (RNA Pol II). (A) Zu Beginn bindet der Transkriptionsfaktor TFIID, der aus dem TATA-Box bindenden Protein (TBP) und mehreren TBP assoziierten Faktoren (TAFs) besteht, an Kernpromotorelemente des Promotors. (B) Durch die Bindung weiterer Transkriptionsfaktoren wird der basale Prä-Initiationskomplex stabilisiert. Die RNA-Polymerase II wird zum Promotor rekrutiert und die Transkription wird initiiert. Modifiziert nach Sikorski (2008).

Im Genom höherer Eukaryoten konnten mehrere Gene identifiziert werden, die verschiedene TAF-Varianten als auch TBP-ähnliche Faktoren kodieren (Kim *et al.*, 2005; Thomas *et al.*, 2006). Es liegen somit verschiedene Varianten des TFIID Multiproteinkomplexes vor, die vermutlich selektiv an verschiedene Promotoren binden können. Hinzuzufügen bleibt, dass einige TFIID Untereinheiten nur in spezifischen Zelltypen bzw. in spezifischen Entwicklungsstadien exprimiert werden (Deato *et al.*, 2007; Reina *et al.*, 2007).

2.7 In *Drosophila* wird ein testisspezifischer TFIID-Komplex postuliert, welcher die Transkription post-meiotisch relevanter Gene aktiviert

White-Cooper *et al.*, (2011) postulieren im *Drosophila*-Testes neben dem somatischen zusätzlich einen testisspezifischen TFIID-Komplex. Der somatische TFIID-Komplex initiiert die Transkription der Gene, deren Transkripte direkt translatiert werden, während der testisspezifische die Transkription der post-meiotisch relevanten Gene aktiviert, deren mRNAs translational reprimiert werden (White-Cooper *et al.*, 2011) (siehe Abbildung 7). Dieser postulierte testisspezifische TFIID-Komplex setzt sich aus mehreren ebenfalls testisspezifischen TATA-Box bindenden Protein-assoziierten Faktoren (tTAFs) sowie aus einer Isoform des kanonischen TAF1, vermutlich TAF1-2, zusammen (Hiller *et al.*, 2004; Hiller *et al.*, 2001; Metcalf *et al.*, 2007). Bisher sind fünf tTAFs in *Drosophila* bekannt, Cannonball (*can*, dTAF5-Homolog), Meiosis I arrest (*mia*, dTAF6-Homolog), No hitter (*nht*, dTAF4-Homolog), Ryan express (*rye*, dTAF12-Homolog) und Spermatocyte arrest (*sa*, dTAF8-Homolog) (Hiller *et al.*, 2004; Hiller *et al.*, 2001). Für die Expression von Spermatogenesegenen besitzt *Drosophila* testisspezifische Promotoren (Renkawitz-Pohl *et al.*, 2005). Es konnte gezeigt werden, dass die Transkription der Spermiogenese-relevanten Gene *fuzzy onions* (*fzo*), *male specific transcript 87F* (*mst87F*) und *don juan* (*dj*) von den tTAFs abhängt (Hiller *et al.*, 2004; White-Cooper *et al.*, 1998).

tTAFs werden in Spermatozyten exprimiert und sind über den Chromosomenregionen liegend als auch im Nukleolus detektierbar (Chen *et al.*, 2005). Wie in Abschnitt 2.4 beschrieben, werden die post-meiotisch

relevanten Transkripte bereits in frühen Spermatozyten transkribiert und translational reprimiert. Dass bedeutet, dass die Transkripte dieser Gene in somatischen Zellen als auch in Spermatogonien reprimiert werden. Chen *et al.*, (2005) postulieren die Repression dieser Gene über den sogenannten Polycomb-Repressiven-Komplex 1 (PRC1) in *Drosophila*. Es wird beschrieben, dass Polycomb (Untereinheit des PRC1 in *Drosophila*) bis zum Stadium der primären Spermatozyten am Promotor post-meiotisch relevanter Gene (z. B. *mst87F*) lokalisiert ist und so die Transkription dieser Gene reprimiert. In den primären Spermatozyten wird Polycomb durch die tTAFs zum Nukleolus rekrutiert und so die Transkription post-meiotisch benötigter Gene (z. B. *mst87F*) initiiert. Belegt wird diese Hypothese durch Versuche an homozygoten tTAF-Mutanten, in denen mittels Chromatin-Immunoprecipitation mit anschließender quantitativer „Real-Time“-PCR und Immunfluoreszenz gezeigt wurde, dass Polycomb nicht mehr zum Nukleolus der primären Spermatozyten rekrutiert wird und am Promoter post-meiotisch relevanter Gene angereichert ist (siehe Abbildung 7) (Chen *et al.*, 2005; White-Cooper *et al.*, 2011).

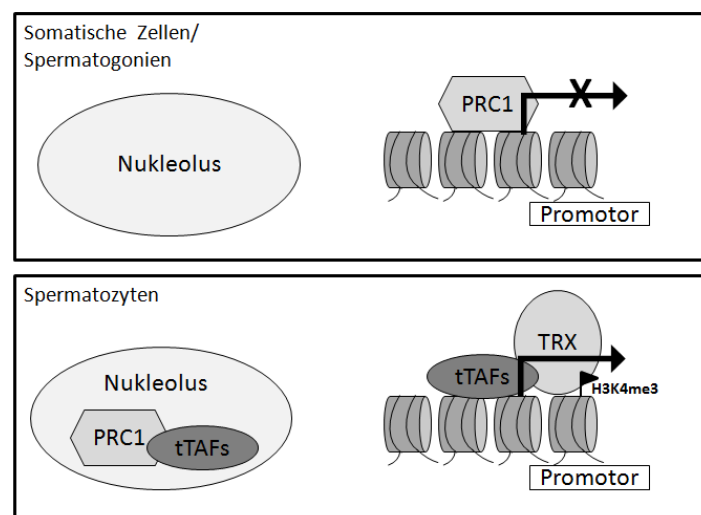


Abbildung 7: Modell der Transkriptionsregulation Spermiogenese-relevanter Gene in *Drosophila*

Laut Modell wird die Transkription der post-meiotisch relevanten Gene durch die Bindung des Polycomb-Repressiven-Komplexes 1 (PRC1) an den Promotoren dieser Gene in Spermatogonien und den somatischen Zellen des Testes reprimiert (Bild oben). In den primären Spermatozyten wird der PRC1 mit Hilfe der tTAFs vom Promoter dieser Gene entfernt, zum Nukleolus rekrutiert und die Transkription dieser Gene wird initiiert. Die Transkriptionsinitiation wird u. a. durch die Rekrutierung von Transkriptionsaktivierenden Proteinen wie z. B. Trithorax (TRX), einer Histon-Methyltransferase initiiert (Bild unten). Die Rekrutierung dieser transkriptionsaktivierenden Proteine ist nach diesem Modell von tTAFs abhängig. Modifiziert nach Chen *et al.*, (2005).

Neuere Daten über die postulierte Reprimierung der post-meiotisch relevanten mRNAs durch den PRC1 stehen im Widerspruch zu dem Modell aus Chen *et al.*, 2005. El-Sharnouby *et al.*, (2013) konnte jedoch die Assoziation von Polycomb am Promotor Spermiogenese-relevanter Gene in tTAF-Mutanten als auch im Wildtyp nicht verifizieren. Somit belegt El-Sharnouby *et al.*, (2013), dass PRC1 nicht für die Repression der post-meiotisch relevanten Transkripte in *Drosophila* verantwortlich ist.

Ob ein testisspezifischer TFIID-Komplex auch in *Mammalia* existiert, ist bisher nicht bekannt. Es wird jedoch vermutet, dass auch in Säugern testisspezifische Paraloge der allgemeine Transkriptionsfaktoren existieren

(White-Cooper *et al.*, 2011). In Mäusen konnten bisher, zwei im Testes stark angereicherte TAF-Paraloge identifiziert werden, TAF4b und TAF7L. TAF4b, ein keimzellenspezifisches Paralog zu TAF4, ist in Ovarien Teil eines TFIID-Komplexes und ist essentiell für die Regulation der selektiven Expression von ovarienspezifischen Genen (Freiman *et al.*, 2001). Falender *et al.*, 2005 zeigten, dass TAF4b im Nukleus muriner Spermatiden detektierbar ist. Bekannt ist zudem, dass murine *Taf4b-null*-Mutanten ab dem Alter von drei Monaten steril werden (Falender *et al.*, 2005). TAF7L, ein keimzellenspezifisches Paralog des somatischen TAF7, ist vermutlich Teil eines TFIID-Komplexes, und es konnte gezeigt werden, dass TAF7L mit TAF1 interagiert (Pointud *et al.*, 2003). Stark exprimiert findet sich TAF7L in späten pachytänen Spermatozyten und runden Spermatiden (Pointud *et al.*, 2003). Des Weiteren konnte im Hefe-Zwei-Hybrid-System eine Interaktion mit den Hefe-Homologen von TAF7 (TAF67) und BRD4 (BRD1) belegt werden (Matangkasombut *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2007).

Zusätzlich zu den schon genannten Paralogen konnten drei weitere kanonische TAFs in Mäusen identifiziert werden, TAF2, TAF5 und TAF6, die insbesondere im Nukleus von Spermatozyten und frühen Spermatiden vermehrt vorliegen (laufende Doktorarbeit Elisabeth Klaus, Philipps-Universität Marburg, bisher unveröffentlichte Daten). Die zitierten Berichte erlauben die Ableitung, dass in Testes von *Mammalia* möglicherweise ein testisspezifischer TFIID-Komplex existiert.

2.8 *Drosophila* besitzt testisspezifische Bromodomänen-Proteine die an der Transkriptionsaktivierung beteiligt sein könnten

Im vorherigen Abschnitt wurde beschrieben, dass für *Drosophila* ein testisspezifischer TFIID-Komplex postuliert wird, der die Transkription Spermiogenese-relevanter Gene aktiviert. Jüngst identifizierte Proteine sind ebenfalls spezifisch in Testes von *Drosophila* exprimiert und könnten an der Transkriptionsaktivierung beteiligt sein. Dabei handelt es sich um Bromodomänen-Proteine (siehe Abschnitt 2.5). Bisher sind in *Drosophila* drei spezifisch in Testes exprimierte BRD-Proteine identifiziert worden: tBRD-1 (Testis-specifically expressed bromodomain containing protein-1), tBRD-2 (Testis-specifically expressed bromodomain containing protein-2) und tBRD-3 (Testis-specifically expressed bromodomain containing protein-3) (Leser *et al.*, 2012; Theofel *et al.*, 2014). tBRD-2 und tBRD-3 zählen zur Familie der BET-Proteine und besitzen im Vergleich zu tBRD-1, das zwei BD besitzt, jeweils nur eine. Somit konnte zum ersten Mal belegt werden, dass im Tierreich BET-Proteine existieren, die wie jene in Pflanzen nur eine BD besitzen (Theofel *et al.*, 2014). Im Nukleus primärer Spermatozyten ist eine partielle Kolo-kalisation von tBRD-1 mit TAF1 und Polycomb nachgewiesen wobei belegt wurde, dass die tBRD-1-Lokalisation von tTAFs abhängig ist (Leser *et al.*, 2012). Des Weiteren konnten die Autoren Theofel *et al.*, (2014) mittels Microarray-Analyse zeigen, dass tBRD-1 direkt oder indirekt an der testikulären Aktivierung hunderter Gene beteiligt ist. Obwohl tBRD-1 nur in Spermatozyten exprimiert wird, weisen *tbrd-1*-mutante Fliegen einen post-meiotischen Phänotyp auf, das heißt, es treten Spermatiden auf, die nicht in der Lage sind zu elongieren

(Leser *et al.*, 2012; Theofel *et al.*, 2014). Wie tBRD-1 werden tBRD-2 sowie tBRD-3 in primären Spermatozyten über Chromosomenregionen exprimiert (Leser *et al.*, 2012; Theofel *et al.*, 2014). Theofel *et al.*, (2014) berichten, dass tBRD-1 mit tBRD-2, tBRD-3 und den tTAFs teilweise in primären Spermatozyten colokalisiert. Die gleiche Arbeitsgruppe betont, dass tBRD-1 homodimerisiert und mit tBRD-2, tBRD-3 und tTAFs zu interagieren vermag (Theofel *et al.*, 2014). Basierend auf diesen Ergebnissen vermuten die Autoren die Existenz eines Komplexes, welcher an der Transkription (z. B. post-meiotisch relevanter Gene) in primären Spermatozyten beteiligt sein könnte (siehe Abbildung 8). Ob ein solcher testisspezifischer Transkriptionsinitiationskomplex auch in *Mammalia* existiert, ist bisher nicht bekannt.

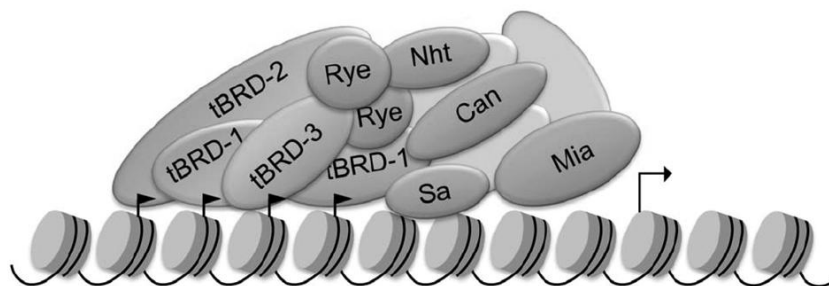


Abbildung 8: Modell für die Funktion von tBRD-1 - 3 und den tTAFs in primären Spermatozyten

Schematische Darstellung des postulierten Komplexes, bestehend aus dem homodimerisierten tBRD-1, tBRD-2, tBRD-3, den tTAFs (Rye, Nht, Can, Sa, Mia) sowie unbekannten Proteinen (hellgrau), die die Transkription bestimmter Gene in primären Spermatozyten aktivieren. Es wird postuliert, dass tBRDs an acetylierte Histone (schwarze Fahnen) binden und diese Bindung wiederum tTAFs sowie weitere Transkriptionsfaktoren zum Chromatin rekrutieren, wodurch letztendlich die Genaktivierung initiiert wird. Modifiziert nach Theofel *et al.*, (2014).

2.9 Klassische Bromodomänen-Proteine in Testes von *Mammalia*

Bisher ist in Säugern nur ein BRD-Protein bekannt, das spezifisch in Keimzellen exprimiert wird, das BET-Protein BRDT. Wie bereits in Abschnitt 2.5 beschreiben, besitzen BET-Proteine u. a. zwei Bromodomänen mit denen diese Proteine z. B. an acetylierte Histone ankoppeln. Im Vergleich zu den anderen BET-Proteinen (BRD2, BRD3 und BRD4) wird BRDT nicht abundant exprimiert, sondern ist nur in Keimzellen detektierbar (Barda *et al.*, 2012; Paillisson *et al.*, 2007; Shang *et al.*, 2004). In Mäusen ist BRDT zum einem im Nukleus pachytäner und diplotäner Spermatozyten sowie frühen Spermatiden (Männchen) (Shang *et al.*, 2007) zum anderen in Oozyten (Weibchen) (Paillisson *et al.*, 2007) detektierbar. Mäuse mit einer Deletion der ersten Bromodomäne (BD1) sind zwar lebensfähig aber steril (Shang *et al.*, 2007). BRDT-„knockout“-Mäuse zeigen einen Stillstand der Meiose in Testes (Gaucher *et al.*, 2012). In humanen Testes ist BRDT im Nukleus der Spermatozyten, Spermatiden und in den Spermatozoa aus Ejakulat vorzufinden (Barda *et al.*, 2012). In Patientenpräparaten die einen Arrest in der Reifung der Spermatozyten aufweisen, konnte BRDT kaum nachgewiesen werden (Barda *et al.*, 2012). In Mäusen wird postuliert, dass BRDT an der Transkriptionsregulation während der Spermatogenese beteiligt ist, und zwar durch die Bindung am

Promotor meiotisch und post-meiotisch relevanter Gene (Gaucher *et al.*, 2012). Zudem wird BRDT eine weitere Funktion in der post-meiotischen Phase zugesprochen. Beschrieben wird, dass BRDT durch die Interaktion mit hyperacetyliertem Histon H4 die Kondensation des Chromatins in haploiden Spermatiden induziert (Pivot-Pajot *et al.*, 2003).

Neben BRDT sind weitere klassische BRD-Proteine in Testes von *Mammalia* identifiziert. Die BRD1-Expression im Nukleus menschlicher Spermatozyten wurde von McCullagh *et al.*, (1990) beschrieben. BRD2 wiederum wurde in Mäusen als nukleäres schwaches Signal in Spermatogonien und als starkes Signal in diplotänen Spermatozyten sowie runden Spermatiden nachgewiesen (Shang *et al.*, 2004). Die Deletion von *Brd2* führt zur Letalität in Mäusen im Verlauf der Embryonalentwicklung (Shang *et al.*, 2007). Das Transkript *Brd3* ist in Testes von Mäusen als dominantes Signal im Nukleus runder Spermatiden vorzufinden (Shang *et al.*, 2004). BRD4 hingegen im Nukleus von Sertoli-Zellen und Spermatogonien (hoch exprimiert), als auch in präleptotänen Spermatozyten (niedrig exprimiert) (Shang *et al.*, 2004). Murine Embryonen mit deletiertem *Brd4* sterben kurz nach der Implantation (Houzelstein *et al.*, 2002). Übereinstimmend finden sich die Transkripte von *Brd2*, *Brd3* und *Brd4* in humanen Testes von Patienten mit normaler Spermatogenese und „Sertoli-Zellen Only-Syndrom“ (Barda *et al.*, 2012).

Ob BRD1, BRD2, BRD3 und BRD4 analog zu BRDT ebenfalls an der Transkription oder Reorganisation des Chromatins im Verlauf der Spermatogenese beteiligt sind, ist derzeit nicht bekannt. Gleichmaßen ist unklar, ob neben den genannten klassischen BRD-Proteinen weitere klassische BRD-Proteine (BRD7, BRD8, BRD9) in Testes von *Mammalia* existieren. Für *Drosophila* wird postuliert, dass tBRDs mit tTAFs an einer testisspezifischen Transkriptionsinitiation beteiligt sein könnten. Die Existenz eines solchen Komplexes in *Mammalia* ist bisher noch nicht beschrieben worden.

2.10 Der Aufbau der Polycomb-Repressiven-Komplexe 1 und 2 (PRC1/PRC2)

In *Drosophila* soll der Polycomb-Repressive-Komplex 1 die Transkription der Spermiogenese-relevanten Gene bis hin zu den primären Spermatozyten reprimieren (siehe Abschnitt 2.7). Hier werden die aktuellen Modelle, die den Aufbau und die Funktion des Repressors PRC1 und PRC2 beschreiben zusammengefasst. Der Polycomb-Repressive-Komplex (PRC) ist ein Multiproteinkomplex. In *Drosophila* und *Mammalia* existieren PRC1 und PRC2 (Margueron *et al.*, 2011). Obwohl beide konserviert sind, verfügen sie in *Mammalia* über mehrere, verschiedene Untereinheiten aus denen verschiedene Typen des PRC1 und PRC2 gebildet werden können (siehe Abbildung 9) (Simon *et al.*, 2013).

Der humane PRC2 setzt sich primär aus vier Kernuntereinheiten zusammen: Rb-associated protein 48 (RbAp48), Suppressor of zeste homologue 12 (SUZ12), Enhancer of zeste homologue 2 (EZH2) und Embryonic ectoderm development (EED). Eine Assoziation mit weiteren Untereinheiten wird jedoch nicht ausgeschlossen. Zu fast allen vier Kernuntereinheiten, gibt es alternative Untereinheiten aus denen sich PRC2 zusammensetzen kann (siehe Abbildung 9A, dargestellt durch punktierte Linien). Der PRC2 ist vor

allein an der Kompaktierung des Chromatins (Repression) sowie an der Methylierung des Histons H3 an Lysin 27 (H3K27me_{2/3}) beteiligt. Die H3K27me_{2/3} soll durch die SET-Domäne der Histonmethyltransferase EZH1/EZH2 vermittelt werden (siehe Abbildung 9A) (Schuettengruber *et al.*, 2007; Simon *et al.*, 2013). Auch ist PRC2 an der Erhaltung der Zellidentität, der Proliferation, der Differenzierung und der Plastizität von Stammzellen beteiligt (Cao *et al.*, 2002; Czermin *et al.*, 2002; Kuzmichev *et al.*, 2002; Margueron *et al.*, 2011; Müller *et al.*, 2002).

Der humane PRC1-Komplex setzt sich ebenfalls aus vier Kernuntereinheiten zusammen: dem Ring finger protein 1/b (RING1B/RNF2), Chromobox homolog 2 (CBX2), Polyhomeotic-like protein 1 (PH1) und B cell-specific moloney murine leukaemia virus integration site 1 (BMI1). Die Zusammensetzung des PRC1 ist sehr variabel, da auch dieser Komplex eine Vielzahl an alternativen Untereinheiten besitzt (siehe Abbildung 9B). Laut den Autoren Cao *et al.*, (2002) und Francis *et al.*, (2004) katalysiert PRC1 die Monoubiquitylierung des Histons H2A (H2AK119Ub1) und ist an der Kompaktierung der Polynukleosomen des Chromatins und somit an der Reprimierung dieser Gene beteiligt. Vermittelt wird die H2AK119Ub1 über die PRC1-Untereinheit RING1, eine E3-Ubiquitin-Protein-Ligase mit einer RING-(really interesting new gene)-Finger-Domäne (Satijn *et al.*, 1997). Die von PRC1 und PRC2 vermittelten PTMs (H2AK119Ub1 und H3K27me_{2/3}) werden immer im Zusammenhang mit der Repression von Genen gesehen (Simon *et al.*, 2013).

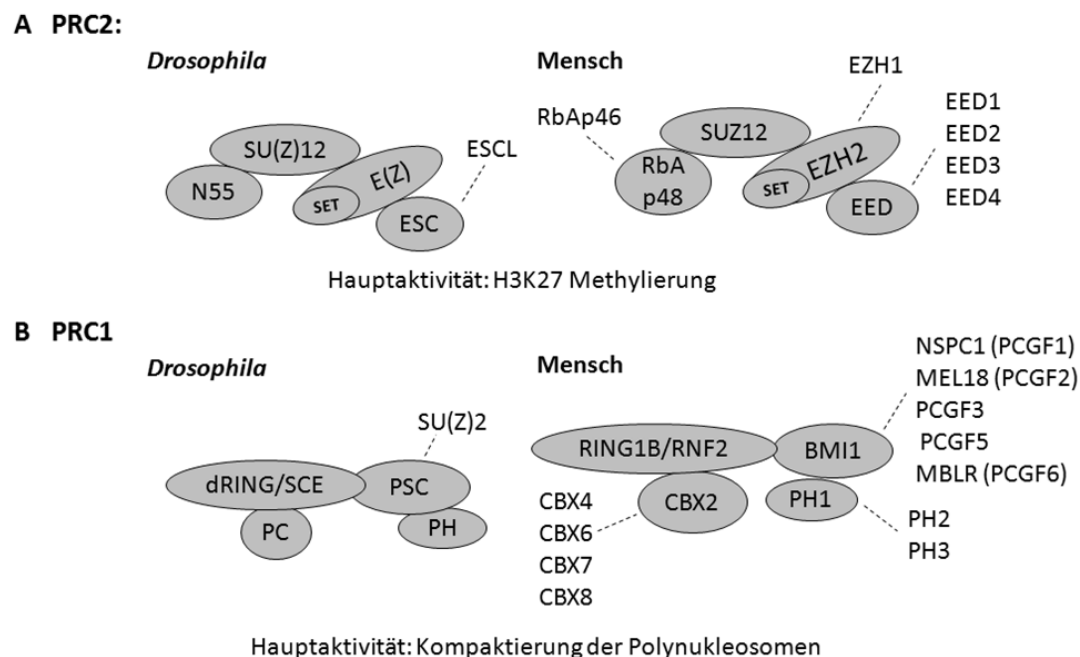


Abbildung 9: Vergleichende Darstellung der Modelle für die Zusammensetzung der kanonischen PRC2 und PRC1 zwischen *Drosophila* und Mensch

(A) Schematische Darstellung der PRC2-Komplexe. In grau sind die vier Kernuntereinheiten des PRC2 dargestellt, die zwischen *Drosophila* und Menschen konserviert sind. Die punktierten Linien repräsentieren Alternativen zu den dargestellten Untereinheiten des Komplexes. (B) Abbildung der Zusammenstellung der möglichen PRC1-Komplexe in *Drosophila* und Mensch. Auch hier sind die vier Kernuntereinheiten in grau gezeichnet. Modifiziert nach Simon *et al.*, (2013).

Wie genau PRC1 und PRC2 untereinander und mit dem Chromatin interagieren ist noch nicht bekannt. In *Drosophila* wird jedoch folgendes Modell postuliert PRC2 bindet an H3K27me₃, aktiviert dadurch die eigene Histonmethyltransferase, was wiederum weitere Methylierungen an H3-Histonen (H3K27me₃) auslöst (Hansen *et al.*, 2008; Margueron *et al.*, 2009). In einem anschließenden Prozess bindet nun PRC1 an H3K27me₃, was die Monoubiquitylierung des Histons H2A (H2AK119Ub1) zur Folge hat (Fischle *et al.*, 2003; Min *et al.*, 2003; Scheuermann *et al.*, 2012). Unabhängig von diesem postulierten Vorgang soll PRC1 an der Kompaktierung des Chromatins beteiligt sein (Endoh *et al.*, 2012; Eskeland *et al.*, 2010). Hypothesisiert wird darüber hinaus H2AK119Ub1 als inhibierendes Element bei der Elongation der RNA-Polymerase II (Brookes *et al.*, 2012; Stock *et al.*, 2007).

2.10.1 Existieren PRC1 und PRC2 in Testes von *Mammalia*?

Bisher ist nur die Expression von EZH2 in Testes von *Mammalia* beschrieben. EZH2 konnte in murinen Testes im Nukleus der runden Spermatiden in der Nähe der akrosomalen Region detektiert werden. Des Weiteren ist belegt, dass EZH2 mit der testisspezifischen H1-Histonvariante H1T2 kolokalisiert und mit dieser interagiert (Lambrot *et al.*, 2012). Mäuse mit deletiertem EZH2 sind nicht lebensfähig und sterben kurz nach der Implantation an starken Entwicklungsstörungen sowie an proliferativen Defekten (Pasini *et al.*, 2004).

Ob neben EZH2 weitere Untereinheiten der PRC in Testes von Säugern exprimiert werden, ist nicht bekannt. Auch ist nicht geklärt ob die reprimierenden Komplexe PRC1 und PRC2 überhaupt in Testes von *Mammalia* vorkommen.

3 Zielsetzung

In Testes von *Drosophila* gilt die Hypothese, dass zwei TFIID-Komplexe für die Transkriptionsinitiation in Anspruch genommen werden. Zum einen ein somatischer TFIID-Komplex, zum anderen ein testisspezifischer TFIID-Komplex. Die Transkripte, die vom somatischen TFIID-Komplex transkribiert werden, werden direkt translatiert. Im Kontrast dazu werden die vom testisspezifischen TFIID-Komplex transkribierten Transkripte (post-meiotisch relevante mRNAs) translational reprimiert und bei Bedarf selektiv translatiert (White-Cooper *et al.*, 2011). Laut der Hypothese von Chen *et al.*, (2005) werden die Spermiogenese-relevanten Gene bis zum Zellstadium der primären Spermatozyten von dem Polycomb-Repressivem-Komplex 1 reprimiert. Im Verlauf dieses Zellstadiums soll PRC1 durch tTAFs vom Promotor dieser Gene zum Nukleolus der Spermatozyten rekrutiert und die Transkription der Spermiogenese-relevanten Gene mit Unterstützung der tTAFs initiiert werden (siehe Abbildung 7). In Säugern ist *bis dato* nicht beschrieben worden, ob die reprimierenden Komplexe PRC1 und PRC2 in Testes vorhanden sind und ob diese reprimierenden Komplexe an der Repression der post-meiotisch relevanten Gene involviert sind. In *Drosophila* wird ein testisspezifischer Komplex postuliert, der u. a. aus tTAFs und tBRD-1, tBRD-2 sowie tBRD-3 aufgebaut und an der Transkriptionsaktivierung in primären Spermatozyten involviert sein soll (siehe Abbildung 8) (Theofel *et al.*, 2014). Auch hier wurde die Präsenz eines solchen Komplexes in *Mammalia* noch nicht belegt. Bisher ist lediglich ein BRD-Protein identifiziert worden (BRDT), dass spezifisch in Keimzellen exprimiert wird und möglicherweise an der Transkriptionsaktivierung als auch an der Restrukturierung des Chromatins beteiligt ist (Gaucher *et al.*, 2012; Pivot-Pajot *et al.*, 2003). Zwar konnten in *Mammalia* weitere klassische BRD-Proteine (BRD1 – BRD4) in Testes nachgewiesen werden (McCullagh *et al.*, 1999; Shang *et al.*, 2004), wissenschaftlich ist jedoch nicht analysiert worden, ob BRD1 – BRD4 wie BRDT an der Transkriptionsinitiation sowie post-meiotischen Reorganisation des Chromatins involviert sind. Auch ist nicht beantwortet, ob und in welchem Rahmen die anderen klassischen BRD-Proteine (BRD7 - BRD9) in Testes von Säugern exprimiert werden. Entsprechend sollten in der vorliegenden Arbeit die nachfolgend gelisteten Fragestellungen evaluiert werden:

1. Kommen neben den bekannten klassischen BRD-Proteinen weitere (klassische) BRD-Proteine im Säugerhoden (Maus und Mensch) vor? Mittels RT-PCR an muriner RNA sollte untersucht werden, ob die Transkripte in Testes von *Mammalia* vorhanden sind. Die Proteinexpression dieser BRD-Proteine im Säugerhoden sollte anschließend mittels Immunmarkierung an Paraffinschnitten verifiziert werden.
2. Könnten diese BRD-Proteine in Testes von *Mammalia* ebenfalls an der Transkriptionsinitiation und/oder am Histon-Protamin-Wechsel involviert sein? Vergleichende Immunmarkierungen mit spezifischen Marker für die Transkription sowie dem Histon-Protamin-Wechsel sollen erste Hinweise liefern, ob die analysierten BRD-Proteine wie BRDT an der Transkription und/oder am Histon-Protamin-Wechsel beteiligt sein könnten.
3. Liegt in Testes von *Mammalia* der Polycomb-Repressive-Komplex 1 und 2 mit seinen klassischen Untereinheiten vor? Die Präsenz der Transkripte für die gängigsten PRC1 und PRC2-Untereinheiten sollte

mittels RT-PCR überprüft werden. Für die Darstellung des (möglichen) Expressionsmusters dieser Untereinheiten war eine Immunmarkierung an humanen und murinen Paraffinschnitten vorgesehen.

4 Material

4.1 Gerätschaften

CFX96®Real Time System C1000TM	Thermal Cycler, BIO-RAD, München
Dampfsterilisator	H+P Labortechnik, München
Einbettformen	Neolab, Heidelberg
Eismaschine	AF-20, Scotsman, Milano, Italien
Entwickler Maschine Optimax Typ TR	Laborgerätehandel Schroeder & Henkel, Wiesloch
Kühl-/ Gefrierschrank (4 °C, -20 °C)	Liebherr, Heidesheim
Gelelektrophoreseapparatur	Werkstatt der Philipps-Universität Marburg
Geltrockner DG1	Biometra, Göttingen
Magnetrührer	Combimac RCT, Staufen
Mikro-Pipetten (1 µl-1000 µl)	Brand, Wertheim
Mikroskop	Axioplan, Zeiss, Göttingen
Mikroskopkamera	AxioCam ICc3, Zeiss, Göttingen
Mikrotom	Leitz, Wetzlar
Mikrowelle	Dimension 4, Panasonic
Mini Trans-Blot® Elektrophorese Apparatur	BIO-RAD, München
Nanodrop Spectrophotometer ND100	PeqLab, Erlagen
Paraffin-Strecktisch	MEDAX, Neumünster
PCR-Maschine	Personal Cycler, Biometra, Göttingen
pH-Meter	GPRT 1400A, Greisinger Electron, Regensburg
Schüttler	Rocky 3D, Fröbel Labortechnik, Lindau
Spannungsquelle	Bio-Rad Power Pack 300, München
Thermoblock	Rotilabo®-Block-Heater H250, Roth, Karlsruhe
UV-Transilluminator	Ultralum, Electronic Dual-Light-Transilluminator, Claremont USA
UV-Gel-Dokumentation	CCD-Kamera Ultralum, Carson Kalifornien USA
Vortexer	M51 Minishaker, RCT, IKA, Staufen
Waage Typ 440-45N	Kern, Balingen
Wasserbad	GFL Labortechnik, Burgwedel
Zentrifugen	Biofuge pico / fresco, Heraeus, Hanau

4.2 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden im Reinheitsgrad *pro Analysis* bezogen und gemäß den Herstellerangaben gelagert und verwendet.

Acrylamid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Albumin Fraktion V	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Bisacrylamid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Chloralhydrat	Roth, Karlsruhe
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Coomassie Brilliant Blau R250	Serva, Heidelberg
3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride	Sigma-Aldrich, Steinheim
Diaminobenzidin (DAB)	Roth, Karlsruhe
Dan Klorix	Colgate Palmolive GmbH, Hamburg
Diethyl pyrocarbonate (DEPC)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Desoxynucleotridiphosphate (dNTPs)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Epon 812	Sigma-Aldrich, Steinheim
Epon Härter DDSA	Sigma-Aldrich, Steinheim
Epon Härter MNA	Sigma-Aldrich, Steinheim

Eponbeschleuniger DMP 30	Sigma-Aldrich, Steinheim
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Formaldehyd (37 % Lösung)	Merck, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
Hämatoxilin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumaluminiumsulfat	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth, Karlsruhe
Natriumjodat	Roth, Karlsruhe
Octylphenolpolyethylenglycolether (Triton X-100)	Roth, Karlsruhe
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Paraplast Plus (Paraffin)	Roth, Karlsruhe
Pikrinsäure (1,3 % wässrig, gesättigt)	Roth, Karlsruhe
Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (Tween 20)	Roth, Karlsruhe
Roti®-Histol	Roth, Karlsruhe
Salzsäure (HCl)	Roth, Karlsruhe
N, N, N', N'-Tetramethyldiamin (TEMED)	Serva, Heidelberg
Tris	Serva, Heidelberg
TRIzol®	Invitrogen, Karlsruhe
UltraPure™ Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Xylencyanol	Merck, Darmstadt
Wasserstoffperoxid	Roth, Karlsruhe
Zitronensäure	Merck, Darmstadt

4.3 Allgemeine Puffer und Lösungen

Gebräuchliche Puffer und Lösungen wurden gemäß der Vorschriften des Laborhandbuchs von Sambrook (1989) angesetzt. Spezielle Puffer und Lösungen sind bei den entsprechenden Methoden aufgeführt.

4.4 Molekulare Reagenzien und Kits

2log DNA Ladder (0,1 - 10 kb)	NEB, Frankfurt am Main
Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate	BIO-RAD, München
Color Plus™ Prestained Ladder	NEB, Frankfurt am Main
iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix	BIO-RAD, München
NE-PER® Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Novex® ECL Chemiluminescent	Invitrogen, Karlsruhe
PerfeCTa® SYBR® Green SuperMix for iQ™	Quanta Biosciences, Gaithersburg USA
QIAGEN® One Step RT-PCR Kit	Quiagen, Hilden
Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit	Roche, Mannheim
TRIzol®	Invitrogen, Karlsruhe
Vectastain® Elite ABC Kit	Vector Laboratories, Peterborough United Kingdom

4.5 Enzyme

Proteaseinhibitoren (100 x)	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
RQ1 RNase-Free DNase	Promega, Mannheim
Taq DNA Polymerase	Axon, Kaiserslautern
VELOCITY DNA Polymerase	Bioline, Luckenwalde

4.6 Synthetische Oligonukleotide (Primer)

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins Genomics (Ebersberg) synthetisiert und in einer Konzentration von 25 pmol/μl verwendet. Die jeweiligen Oligonukleotide sind in der Orientierung 5'nach 3' angegeben.

Primer zum Transkriptionnachweis und für qPCR:

qRT_mactb_fw	GGGACCTGACAGACTACCTCAT
qRT_mactb_rv	GGCATAGAGGTCTTTACGGATG
qRT_mbrd1_fw	GCTCAAAGGATGGTGGAGATAG
qRT_mbrd1_rv	ACTCTACCTCGTTGTCCAGCTC
qRT_mbrd2_fw	AGCTAGTCCTCCTGGGAGTCTT
qRT_mbrd2_rv	TACATCAGCAGCAAACCTCCTGT
qRT_mbrd3_fw	ACAACATCTGCCATCACTGC
qRT_mbrd3_rv	CATCTGGGTACTCTCGGCTATC
BRD4-003_RT_fw	GCCTGAGATGAAGCCTGTAGAC
BRD4-003_RT_rev	GTCCTTCTCCTTCTCTGCAT
qRT_mbrdt_fw	AAACCCAAGGAAAAAGCCTAAG
qRT_mbrdt_rv	GAGCTCCTCCTTAGACCTGACA
qRT_mbrd7_fw	GGGATGAAAATTCTCAGTCAGG
qRT_mbrd7_rv	TTGTCCCATCTGGTTTTCTTCT
qRT_mbrd8_fw	TGATACATGGTGGGGAGATACA
qRT_mbrd8_rv	TGCTATCCATGGAAACAGTCAC
qRT_mbrd9_fw	TGTGTGATAATGCGATGACGTA
qRT_mbrd9_rv	CTTCTTCAGGTACCCCATCTTG
Kat2b-fw	TCCACAAAGAAGAAGATGCAGA
Kat2b-rv	CAGTAGCACAACCACCTTGTGT
Smarca2-fw	GAAGATCCAGAAGCTCTCCAAA
Smarca2-rv	GCTGCTTTCATCTATTGGCTCT
Tif1α-fw	CCAGCTGCTAGAACACAAAGAA
Tif1α-rv	AAAAATGCATGACGTGCTCTAA
qRT_mring1_fw4	TACACCATCTACATCGCTCCTG
qRT_mring1_rev4	GCAGGGTAGGAAACTAGGGTCT
qRT_mbmi1_fw	CGAACAACCAGAATCAAGATCA
qRT_mbmi1_rv	CTCCTCATCTGCAACTTCTCCT
qRT_mcbx2_fw	GCCAGAAGAGAACATTTTGGAC
qRT_mcbx2_rv	TTCTAATGGGATCCTTCAGCTC
qRT_mcbx8_fw	GACTCAGACCTGGTGCAATATG
qRT_mcbx8_rv	TCTGTAACGACCACTTTCTCCA
qRT_mscmh1_fw	GAAGATCCAACAACCTCCCTGAC
qRT_mscmh1_rev	AGGACAAAGGTTTCACCTGGTA
qRT_mezh2_fw	AGAGAAGCAGGGACTGAAACTG
qRT_mezh2_rv	CAACCGATGTTTCCTTTTCTTC
qRT_meed_fw	ATTGAGAGTGGCACAACACAG
qRT_meed_rev	TGTTGCTATCATAGGTCCATGC
qRT_msuz12_fw	AGCAACATGGGAGACAATTCTT
qRT_msuz12_rv	CTGGCTTCTGTCTGTTGTCTTG

Primer für spezifische Marker von Keimzellen:

mSOX9-for	AGGAAGCTGGCAGACCAGTA
mSOX9-rev	CCCTCTCGCTTCAGATCAAC
mZbtb16_fw	GCCACCTTCGCTCACATAC
mZbtb16_rev	GTGGCAGAGTTTGCACCTCAA
mKit_fw	ATGGAAGGTTGTGCGAGGAGA
mKit_rev	ATGGCAGCATCCGACTTAAT

mSycp3_fw	AGCCAGTAACCAGAAAATTGAGC
mSycp3_rev	CCACTGCTGCAACACATTTCATA
mCpa6_fw	GAACCAGAAAGTGAAGGCTGT
mCpa6_rev	CTTTAGCAGGTGCATTGTGAT
mPrm2_fw	GAGGCTACATAGGATCCACAAGAGG
mPrm2_rev	GCTTAGTGATGGTGCCTCCTACATT

4.7 Verwendete Spezies

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit dem *Mus Musculus*-Stamm C57BL/6NCrl in den Altern 7 dpp, 16 dpp, 25 dpp und 12 Wochen (adulte Tiere) der Firma Charles River gearbeitet. Die humanen Testespräparate wurden uns freundlicherweise aus der Plattform: „Testicular Biopsy Repository“ der AG-Bergmann, Justus-Liebig-Universität Gießen, zur Verfügung gestellt. Die Klassifizierung der Patienten mit Hypospermatogenese und normaler Spermatogenese wird in Abschnitt 5.3.6 beschrieben. Alle Immunhistologischen Untersuchungen wurden an den folgenden Patienten durchgeführt.

Tabelle 2: Informationen der verwendeten Patienten

Patient	Alter	Klassifizierung
116/07 li	70 Jahre	Hypospermatogenese (HYP)
10/14 re	38 Jahre	Normale Spermatogenese (NSP)

4.8 Software und Datenbanken

Textverarbeitung:	MS Office 2007	
Bildbearbeitung:	Adobe® Photoshop® CS2 9.0 Axiovision Rel. 4.8 Microsoft Paint.NET	
Primer Design:	ApE-A plasmid Editor (v1.17) OligoCalc (v. 3.25) Primer3 (v. 0.4.0)	(Kibbe, 2007) (Untergasser et al., 2012)
Genanalysen:	Bio-Rad CFX Manager2.0 Clustal W2 Ensemble Genome Browser Mammalian Reproductive Genetics (MRG) Mouse Genome Database (MGI) 5.18 SIB Bioinformatics Resource Porta (ExPASy) PubMed-NCBI The Universal Protein knowledgebase (UniProt)	(Larkin et al., 2007) (Flicek et al., 2011) (Connolly et al., 2009) (Blake et al., 2002) (Artimo et al., 2012) (McEntyre et al., 2001) (Magrane et al., 2011)

4.9 Verwendete Antikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper sind in der folgenden Tabelle mit entsprechender Verdünnung aufgeführt (siehe Tabelle 3). In Klammern ist die jeweilige Methode angegeben wobei IHC für Immunhistochemie und WB für Westerblot steht. Für die IHC ist des Weiteren vermerkt für welche primären Antikörper die Demaskierung nicht im normalen Citratpuffer, sondern im Antigen Retrieval Buffer

pH 6 stattfand (als pH 6 markiert).

Mit der Peptidsequenz der Antikörper wurde zusätzlich ein Sequenzalignment mit den entsprechenden Proteinen der verschiedenen Spezies durchgeführt um die spezifische Bindung der Antikörper *in silico* zu überprüfen.

Tabelle 3: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten primären Antikörper

	Antikörper	Herkunft	Verdünnung Mensch	Verdünnung Maus	Lieferant
BRDs:	α -BRD1	Kaninchen	-	1:200 (WB)	Abcam: 718977
	α -BRD2	Kaninchen	1:30 pH 6 (IHC)	1:500 pH 6 (IHC) 1:250 (WB)	Sigma: HPA042816
	α -BRD3	Kaninchen	1:50 pH 6 (IHC)	- 1:500 (WB)	Abcam: 83478
	α -BRD4	Kaninchen	-	1:150 (IHC) (WB)	Abcam: ab84776
	α -BRDT	Kaninchen	1:850 (IHC)	1:750 (IHC) 1:3000 (WB)	Abcam: ab5157
	α -BRD7	Kaninchen	-	1:200 (WB)	Abcam: 46553
	α -BRD8	Kaninchen	1:200 pH 6 (IHC)	1:200 pH 6 (IHC) 1:300 (WB)	Sigma: HPA001841
	α -SMARCA2	Kaninchen	1:750 (IHC)	- 1:10 000 (WB)	Sigma: AV34484
PRC:	α -TIF1 α	Kaninchen	-	1:400 (IHC)	Abcam: ab70560
	α -RING1	Kaninchen	1:50 (IHC)	1:100 (IHC) 1:300 (WB)	Abgent: AP2516a
	α -EZH2	Kaninchen	1:600 (IHC)	1:400 (IHC) 1:600 (WB)	Abcam: ab3748
Sonstige:	α -RNA-Pol II CTD P-S5	Kaninchen	1:500 (IHC)	1:500 (IHC)	Abcam: ab5131
	α -H4ac (K5/8/12/16)	Kaninchen	1:200 (IHC)	1:200 (IHC)	Millipore: 06-598
	α -TNP1	Kaninchen	1:1000 (IHC)	1:500 (IHC)	Abcam: ab73135
	α -PRM1	Maus	1:500 (IHC)	1:500 (IHC)	Briar Patch Biosciences: MAb-001 Hup 1N
	α -PRM2	Maus	1:500 (IHC)	1:500 (IHC)	Briar Patch Biosciences: MAb-002 Hup 2B
	α -AKTIN	Kaninchen	-	1:2000 (WB)	Cell Signaling: 49682

Je nach Herkunft der primären Antikörper wurde entsprechend einer der folgenden sekundären Antikörper verwendet (siehe Tabelle 4):

Tabelle 4: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten sekundären Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Referenz
α -Kaninchen, biotinyliert IgG (H+L)	1:250	Vector Laboratories: BA-1000
α -Kaninchen, Peroxidase gekoppelt IgG (H+L)	1:5000	Vector Laboratories: PI-1000
α -Maus, biotinyliert IgG (H+L)	1:250	Vector Laboratories: BA-2000

4.10 Sonstige Materialien

Dako-Pen (Fettstift)	Dako, Hamburg
Deckgläschen (24 x 60 mm)	Roth, Karlsruhe
Färbeküvetten/Färbekammern	Glaswerk Wertheim, Wertheim
Homogenisator (Potter)	B. Braun, Melsungen
Mikro-Pipetten Spitzen (1 μ l - 1000 μ l)	Sarstedt, Nümbrecht
Mikrotom-Klinge A35	pfm medical, Köln
Nitrozellulosemembran Optitran BA-S 83	GE Healthcare Life Sciences, München
Objektträgerkästen	Neolab, Heidelberg
Parafilm	American National, Chicago USA
PCR-Gefäße (200 μ l, 500 μ l)	Sarstedt, Nümbrecht
Plastik-Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Plastikröhren (15 ml, 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Präparierbesteck	Neolab, Heidelberg
Röntgenfilme	Fujifilm, Tokyo Japan
Röntgenfilmfixierer	AGFA, Mortsel Belgien
Röntgenfilmentwickler	AGFA, Mortsel Belgien
SuperFrost®-Objektträger	Menzel GmbH, Braunschweig
96-Well Platten	Sarstedt, Nümbrecht
Whatman-Papier	Schütt, Göttingen

5 Methoden

5.1 Nukleinsäureanalytik

5.1.1 Isolierung von gesamt RNA aus murinen Testes

(Chomczynski *et al.*, 2006), (TRIzol®, Invitrogen)

Die Isolation von gesamt RNA aus murinen Testes verschiedenen Alters (7 dpp, 16 dpp, 25 dpp und 12 Wochen) erfolgte durch TRIzol®, welches auf dem Prinzip der Ein-Schritt-RNA-Isolierungsmethode von Chomczynski und Sacchi (2006) beruht.

Für die Isolation von gesamt RNA wurde je 1 Testis in 1 ml TRIzol® (1 ml/50 - 100 mg Gewebe) homogenisiert, 5 Min bei RT inkubiert, 200 µl Chloroform zugegeben, für 15 Sek kräftig gemischt und weitere 5 Min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 12 000 x g, für 5 Min bei 4 °C, wobei der Ansatz grob in zwei Phasen getrennt wird: eine untere Phenol-Chloroform-Phase und in eine obere klare wässrige Phase, in der die RNA enthalten ist. Die oberste Phase wurde vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt, die RNA durch Zugabe von 500 µl Isopropanol gefällt, 10 Min bei RT inkubiert und anschließend für 15 Min bei 12 000 x g und 4 °C zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde mit 500 µl 75 % EtOH für 5 Min bei 12 000 x g und 4 °C gewaschen, für 5 Min bei 57°C getrocknet, in 50 µl ddH₂O DEPC resuspendiert und bei -80 °C gelagert.

5.1.2 Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

(QIAGEN®One Step RT-PCR Kit, Quiagen)

Zum Nachweis von Transkripten im murinen Testes wurden RT-PCR an gesamt RNA durchgeführt. Eine Auflistung der verwendeten Primer befindet sich im Abschnitt 4.6. Ein Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Gesamt RNA	1 µg
5 x QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer	4 µl
dNTP mix (10 mM pro NTP)	1 µl
5'Primer (25 pmol/µl)	1,2 µl
3'Primer (25 pmol/µl)	1,2 µl
QIAGEN OneStep RT-PCR Enzym Mix	0,8 µl
ddH ₂ O DEPC	ad 20 µl

Die RT-PCR wurde nach folgendem Programm durchgeführt:

Reverse Transkription:	30 Min	50 °C
PCR Aktivierung:	15 Min	95 °C
Denaturierung:	94 °C	1 Min
Annealing:	T _m - 5 °C	1 Min
Elongation:	72 °C	1 Min/1000 bp
Anzahl der Zyklen:	35 Zyklen	
Finale Elongation:	72 °C	10 Min

Die resultierenden RT-PCR-Produkte wurden über ein 1,3 % TAE-Agarosegel aufgetrennt und überprüft. Alle RT-PCRs wurden zur Verifikation immer dreimal wiederholt.

5.1.3 DNase-Verdau

(RQ1 RNase-Free DNase, Promega)

Nur gesamt RNA von 7 dpp, 16 dpp und 25 dpp muriner Testes, die der cDNA-Synthese für qPCR dienten, wurde mit DNase behandelt um möglichst reine RNA für die cDNA-Synthese zu erhalten. Für den DNase-Verdau wurde die RNA von drei Tieren je Alter zusammengefasst um individuellen unterschieden entgegen zu wirken. Ein Reaktionsansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

Gesamt RNA	3 µg
10 X RQ1 RNase-Free DNase Reaction Buffer	1 µl
RQ1 RNase-Free DNase (1U/µg RNA)	1 µl
ddH ₂ O DEPC	ad 10 µl

Der Reaktionsansatz wurde für 30 Min bei 37 °C inkubiert. Durch die anschließende Zugabe von 1 µl Stop Solution und einer weiteren Inkubation für 10 Min bei 65 °C wurde die DNase inaktiviert. Als Kontrolle wurde je PCR-Ansatz, eine Test-PCR mit Primer für β -Aktin durchgeführt.

5.1.4 cDNA-Synthese

(Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit, Roche)

Mit Hilfe des Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit wurde DNase verdaute gesamt RNA in cDNA synthetisiert. Hierzu wurde wie folgt vorgegangen:

DNase verdaute gesamt RNA	1 µg
Random Hexamer Primer (600 pmol/l)	2 µl
5 x Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Buffer	4 µl
Deoxynucleotide Mix (10 mM pro NTP)	2 µl
Protector RNase Inhibitor (40 U/µl)	0,5 µl
Transcriptor Reverse Transcriptase (20 U/µl)	0,5 µl
ddH ₂ O DEPC	ad 20 µl

Dieser Reaktionsansatz wurde für 10 Min bei 25 °C, 60 Min bei 50 °C und 5 Min bei 85 °C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion auf Eis abgestoppt und der Reaktionsansatz mit ddH₂O DEPC auf 50 µl aufgefüllt. Zuletzt wurde die Qualität der neu synthetisierten cDNA via Nanodrop überprüft und eine Test-PCR mit β -Aktin Primer angesetzt.

5.1.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

(Mullis *et al.*, 1986; Saiki *et al.*, 1988), (Taq DNA Polymerase, Axon)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode, mit der definierte DNA-Bereiche amplifiziert werden können. Sie basiert auf drei Schritten, die für die Synthese der DNA notwendig sind:

- 1) Denaturierung der Ausgangs-DNA (Template) in ihre Einzelstränge
 - 2) Annealing, d. h. die Bindung der synthetischen Oligonukleotide (Primer) an beide Einzelstränge
 - 3) Elongation, d. h. die Synthese der DNA durch die Polymerase, ausgehend von dem gebundenen Primer
- Die Auswahl und Konzentration der Primer, die Qualität und Menge des Templates, die Pufferbedingungen, Zeiten und Temperatur der einzelnen Zyklusschritte beeinflussen die Synthese der DNA. Eine Auflistung der verwendeten Primer befindet sich im Abschnitt 0. Ein Reaktionsansatz mit der Taq DNA Polymerase setzte sich folgendermaßen zusammen:

Template cDNA	100 ng
10 x Puffer BD	5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	5 µl
5'Primer (25 pmol/µl)	1 µl
3'Primer (25 pmol/µl)	1 µl
dNTPs (10 mM pro NTP)	1 µl
Taq DNA Polymerase (5 U/µl)	0,5 µl
ddH ₂ O	ad 50 µl

Jede PCR wurden nach folgendem Standartprogramm durchgeführt:

Initiale Denaturierung:	95 °C	5 Min
Denaturierung:	95 °C	1 Min
Annealing:	T _m -5 °C	1 Min
Elongation:	72 °C	1 Min/1000bp
Anzahl der Zyklen:	35 Zyklen	
Finale Elongation:	72 °C	10 Min

Die resultierenden PCR-Produkte wurden über ein 1,3 % TAE-Agarosegel aufgetrennt und überprüft. Es wurden alle PCRs zur Verifikation dreimal wiederholt.

5.1.6 Analyse von DNA Fragmente mittels Agarosegelelektrophorese

(Sambrook *et al.*, 1989)

Mit Hilfe der Gelelektrophorese können DNA-Fragmente anhand ihres Molekulargewichts aufgetrennt werden. Die Wanderungsgeschwindigkeit linearer Moleküle verhält sich umgekehrt proportional zum Logarithmus des jeweiligen Molekulargewichts. Die Agarosekonzentration richtet sich nach der Größe der zu trennenden DNA-Fragmente. Angewendet wurde steht ein 1,3 % Agarosegel. Die erforderliche Menge von 1,3 g Agarose wurde in 100 ml 1 x TAE-Puffer durch aufkochen gelöst und nach Abkühlen auf ca. 65 °C mit 2 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) versetzt und gegossen. Ethidiumbromid interkaliert mit der helikalen Struktur der DNA und visualisiert die einzelnen Fragmente unter UV-Licht. Als Laufpuffer diente 1 x TAE-Puffer. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit 1 x Ladepuffer versetzt. Als Marker diente der 2log DNA Ladder (0,1 - 10 kb) von NEB. Das Gel wurde an eine Spannungsquelle angeschlossen und eine Spannung von ca. 80 V bis 100 V angelegt. Beim anschließen der Spannungsquelle ist darauf zu achten, dass DNA bei neutralem pH-Wert negativ geladen ist aufgrund der Phosphate am Rückgrat der Doppelhelix und somit in Richtung der Anode wandert.

Ethidiumbromid:	10 mg/ml in H ₂ O
10 x Ladepuffer:	0,1 % Bromphenolblau 0,1 % Xylencyanol 0,9 % Borsäure 40 % Glycerin in 1 x TAE-Puffer
50 x Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer:	2 M Tris 100 mM EDTA, pH 8 5,71 % (v/v) Essigsäure

5.1.7 Quantitative Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

(Higuchi *et al.*, 1993), (iTaQTMUniversal SYBR®Green Supermix, BIO-RAD; PerfeCTa® SYBR® Green SuperMix for iQTM, Quanta)

Um eine Aussage über mögliche Unterschiede in der Expression von Transkripten in verschiedenen Keimzellen treffen zu können war es erforderlich murine Testes zu untersuchen, die sich in der ersten Welle der Spermatogenese befinden und somit eine unterschiedliche Zusammensetzung an Keimzellen besitzen. Hierzu wurden murine Testes im Alter von 7 Tagen (dpp) gewählt, welche nur Spermatogonien enthalten, 16 dpp welche Spermatogonien und Spermatozyten enthalten und 25 dpp die zusätzliche zu den Spermatogonien und Spermatozyten noch runde Spermatiden enthalten. Die Zusammensetzung der Keimzellen wurde histologisch und via RT-PCR mit spezifischen Marker für die unterschiedlichen Keimzellen untersucht.

Eine Auflistung der verwendeten Primeren befindet sich in Abschnitt 4.6. Von jeder Reaktion der Primer mit unterschiedlichem Alter, wurden jeweils mindestens Duplikate (maximal Triplikate) angesetzt. Die negativ Kontrollen mit gesamt RNA wurden in Duplikaten und mit Wasser Kontrolle als Unikat getestet. Die qPCR wurde immer in 96-Well Platten durchgeführt. Als Haushaltsgen wurde β -Aktin verwendet. Je Primerpaar wurde folgender Reaktionsansatz angesetzt:

Template cDNA (7 dpp, 16 dpp oder 25 dpp)	2 µl (~20 ng)
2 x PerfeCTa SYBR Green SuperMix for iQ	7,5 µl
oder	
2 x iTaq TM Universal SYBR®Green supermix:	7,5 µl
Primer mix (je 10 µM 5'Primer/3'Primer)	0,3 µl
ddH ₂ O	ad 15 µl

Die qPCR wurde unter folgenden Bedingungen mit dem CFX96®Real Time System C1000TM durchgeführt:

Initiale Denaturierung:	95 °C	3 Min
Denaturierung:	95 °C	10 Sek
Annealing:	60 °C	10 Sek
Elongation:	72 °C	30 Sek
Anzahl der Zyklen:	55 Zyklen	
	65 °C	5 Sek
	95 °C	50 Sek

Durch das enthaltene SYBR®Green konnte nach jedem PCR Zyklus die Menge an PRC-Produkt gemessen

werden. Zum Auswerten der Daten wurden die gemessenen Expressionswerte gegen β -Aktin normalisiert und die Expression der 7 dpp murinen Testes auf 1 gesetzt. Im Anschluss wurde die normalisierte Expression der Daten in MS Excel ausgewertet.

5.1.8 t-Test zur Berechnung der Signifikanz

(Student, 1908)

Die resultierenden Expressionswerte der qPCR werden gegen β -Aktin, welches als Haushaltsgen fungierte, normalisiert und die Expression der 7 dpp murinen Testes auf 1 gesetzt. Mit den daraus resultierenden normalisierten Werten wurde mit Hilfe des Mittelwertes, der Standardabweichung und der Anzahl an Wiederholungen der t-Test errechnet. Dabei wurde folgende Legende angewendet:

p-Wert $\leq 0,05$ (*)

p-Wert $\leq 0,01$ (**)

p-Wert $\leq 0,001$ (***)

NS: nicht signifikant

5.1.9 Sequenzierung

Sequenzierungen wurden durch die Firma LGC Genomics GmbH (Berlin) durchgeführt und die Sequenzen mit dem Programm ApE-A plasmid Editor (v1.17) ausgewertet.

5.2 Proteinanalytik

5.2.1 Herstellung von Gesamtproteinextrakt aus murinen Testes

(NE-PER® Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents, Thermo Fisher Scientific)

Für die Isolation von Gesamtproteinextrakt aus murinen Testes verschiedenen Alters wurde das NE-PER® Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents Kit verwendet. Hierzu wurden die Testes (~ 100 mg) für 5 Min bei 500 x g und 4 °C in 500 µl PBS gewaschen, in 1 ml CER I homogenisiert, 15 Sek auf höchster Stufe gevortext und 10 Min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 55 µl CER II wurde erneut für 5 Sek auf höchster Stufe gevortext, der Reaktionsansatz 1 Min auf Eis inkubiert, 5 Sek auf höchster Stufe gevortext und 5 Min bei 4 °C und 16 000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt (zytoplasmatischer Proteinextrakt) und bis auf weiteres auf Eis gelagert. Das Pellet wurde in 500 µl NER resuspendiert, 15 Sek auf höchster Stufe gevortext und für 40 Min auf Eis inkubiert. Während der Inkubation auf Eis wurde der Reaktionsansatz alle 10 Min für 15 Sek auf höchster Stufe gevortext. Zuletzt wurde für 10 Min bei 4 °C und 16 000 x g zentrifugiert und der Überstand (nukleärer Proteinextrakt) zu dem Reaktionsgefäß mit dem zytoplasmatischem Proteinextrakt gegeben. Bis zur weiteren Verwendung wurde der Gesamtproteinextrakt bei -80 °C gelagert.

PBS (pH 7,2):

0,1 M Phosphat

0,15 M Natriumchlorid

Proteaseinhibitoren (100 x): 1 x in CER I
 1 x in NER

5.2.2 Quantitative photometrische Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Bradford-Test

(Bradford, 1976), (Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate, Bio-Rad)

Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe des Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate ermittelt, welches auf dem Prinzip des Bradford-Tests beruht. Hierzu bedient man sich der Tatsache, dass sich das Absorptionsspektrum des Farbstoffes Coomassie brilliant blue G-250 durch die Zugabe einer Proteinlösung von 465 nm auf 595 nm verschiebt. Coomassie brilliant blue G-250 bildet im sauren Milieu mit den kationischen und unpolaren Seitenketten der Proteine einen blauen Farbkomplex dessen Intensität als Maß für die Proteinkonzentration gilt.

Zur Messung der Proteinkonzentration wurde 1 µl Gesamtproteinextrakt mit 799 µl ddH₂O und 200 µl Dye Reagent für 5 Min bei RT schwenkend inkubiert und die Absorption bei 595 nm gemessen. Die Proteinkonzentration wurde mithilfe einer BSA-Eichgeraden und der gemessenen Absorption errechnet.

5.2.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE)

(Laemmli, 1970)

Zur Analyse von Gesamtproteinextrakten wurde die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) verwendet. Mit der SDS-PAGE werden Proteingemische anhand ihres Molekulargewichtes aufgetrennt. Die Auftrennung beruht darauf, dass Proteine mit SDS einen negativ geladenen SDS-Protein-Komplex bilden. Dieser SDS-Protein-Komplex besitzt ein konstantes Ladungs- zu Masseverhältnis wodurch die Proteine mittels einer porösen Polyacrylamidmatrix, anhand ihres Molekulargewichtes aufgetrennt werden.

Zu jeweils 50 µg Gesamtproteinextrakt aus murinen Testes wurde 1 x SDS-PAGE Ladepuffer hinzugefügt und für 5 Min bei 50 °C inkubiert. Das im 1 x SDS-PAGE Ladepuffer enthaltene β-Mercaptoethanol unterbindet die Ausbildung von Quartärstrukturen durch das Verhindern von Protein-Protein-Wechselwirkungen. Zusätzlich zu SDS, dient auch die Inkubation bei 50 °C zur Denaturierung der Proteine. Nach der Inkubation wurden die Proben auf das Polyacrylamidgel geladen. Als Referenz dienten 5 µl Color Plus™ Prestained Ladder von NEB. Die Auftrennung erfolgte in 1 x SDS-PAGE Laufpuffer pH 8,3. Es wurde eine Spannung von 200 V angelegt bis die Lauffront aus dem Polyacrylamidgel ausgetreten war (~1 h). Verwendet wurden stets 10 % Polyacrylamidgele mit einer Dicke von ca. 1 mm.

Sammelgel: 130 mM Tris/HCl (pH 6,8)
 4 % (v/v) Acrylamid
 0,1 % (v/v) SDS
 0,1 % (v/v) APS
 0,1 % (v/v) TEMED

10 % Trenngel: 380 mM Tris/HCl (pH 8,8)

	10 % (v/v) Acrylamid 0,1 % (v/v) SDS 0,14 % (v/v) APS 0,1 % (v/v) TEMED
10 % Ammoniumpersulfat (APS):	10 % APS in H ₂ O
10 x SDS-PAGE Laufpuffer pH 8,3:	25 mM Tris 1,92 mM Glycin 0,1 % SDS
6 x SDS-PAGE Ladepuffer:	270 mM Tris-HCl (pH 6,8) 60 % Glycin 6 % SDS 0,06 % Bromphenolblau 18 % β -Mercaptoethanol
10 % SDS:	10 % SDS in H ₂ O
1 M Tris/HCl (pH 8,8):	1 M Tris in H ₂ O
1 M Tris/HCl (pH 6,8):	1 M Tris in H ₂ O

5.2.4 Westernblot-Analyse

(Towbin *et al.*, 1979)

Im Anschluss an die SDS-PAGE wurden die Proteine elektrophoretisch auf eine Nitrozellulose Membran übertragen. Die Bindung der Proteine an die Membran wird durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Proteinen und der Nitrozellulose ermöglicht. Hierzu wurde die Tauch-Blot-Methode für die Übertragung der Proteine auf die Nitrozellulose Membran gewählt. Durch die Verwendung spezifischer Antikörper konnten die entsprechenden Proteine immunologisch auf der Nitrozellulose Membran nachgewiesen werden.

Dazu wurde das Polyacrylamidgel nach der SDS-PAGE für 15 Min in Transfer-Puffer geschwenkt. Zusätzlich wurde je Polyacrylamidgel 6 Stück Whatman-Papier sowie 1 Stück Nitrozellulose Membran, der Größe des Polyacrylamidgels vorbereitet und mit den Schwämmen der Tauch-Blot Apparatur in Transfer-Puffer gelegt. Zum aktivieren der Proteinbindestellen der Nitrozellulose Membran wurde diese im Vorfeld mit ddH₂O befeuchtet. Die Tauch-Blot Apparatur wurde wie folgt aufgebaut:

(-) Kathode
 Schwamm
 3x Whatman-Papier
 Polyacrylamidgel
 Nitrozellulose Membran
 3x Whatman-Papier
 Schwamm
(+) Anode

Anschließend wurde die Tauch-Blot Apparatur mit Transfer-Puffer aufgefüllt und über Nacht bei 4 °C eine Spannung von 30 V angelegt. Nach dem blotten wurde die Nitrozellulose Membran für 10 Min in 1 x TBS

gewaschen und für 1 h bei RT in Blockingreagenz inkubiert. Das Blockingreagenz dient zur Sättigung der unspezifischen Bindestellen auf der Nitrozellulose Membran. Im Anschluss wurde die Membran über Nacht bei 4 °C mit den entsprechenden primären Antikörpern in Blockingreagenz inkubiert (siehe Abschnitt 4.6). Am folgendem Tag wurde die Nitrozellulose Membran 2-mal für 10 Min in TBS/TT und 1-mal in TBS gewaschen um anschließend für 1 h mit einem Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper in Blockingreagenz inkubiert zu werden. Zuletzt wurde die Nitrozellulose Membran 4-mal für 10 Min mit TBS/TT gewaschen.

Für die indirekte Detektion der primären Antikörper wurde das Novex® ECL Chemiluminescent Substrate Reagent Kit verwendet. Die Peroxidase am Zweitantikörper katalysiert die Oxidation von Luminol, die eine Chemilumineszenz ausgelöst, welche von einem Röntgenfilm detektiert werden kann. Hierzu wurden jeweils 500 µl von Reagenz A (Luminol) und Reagenz B (Enhancer) gemischt und für 1 Min auf die Nitrozellulose Membran gegeben woraufhin die Detektion mittels Röntgenfilm erfolgte.

Als Kontrolle für die Effizienz des blottens, wurde das Polyacrylamidgel nach dem Botten für 2 - 3 h in Coomassie-Färbelösung geschwenkt. Anschließend wurde das Polyacrylamidgel mit Coomassie-Entfärber wieder entfärbt, um die noch vorhanden Proteine auf dem Polyacrylamidgel zu visualisieren. Zur dauerhaften Aufbewahrung wurden die Polyacrylamidgele getrocknet.

Blockingreagenz:	5 % Milchpulver in 1 x TBS
Coomassie-Färbelösung:	0,1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau R250 45 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure
Coomassie-Entfärber:	40 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure
10 x TBS:	100 mM Tris/HCl pH 7,7 1,5 M Natriumchlorid
1 x TBS/TT:	1 x TBS 0,05 % Tween 20 0,2 % Triton X100
Transfer-Puffer:	25 mM Tris/HCl pH 8,3 192 mM Glycin 20 % (v/v) Methanol

5.3 Histologische Arbeiten

5.3.1 Präparieren von murinen Testes

Mäuse unterschiedlicher Alter wurden mittels zervikaler Dislokation getötet. Anschließend wurden diese rücklings fixiert, die Bauchdecke geöffnet und das Abdomen mit einem medianen Schnitt offen gelegt. Um an die Testes zu gelangen wurde das im unterem Abdomen liegende Fettgewebe vorsichtig angehoben, die Testes vom umliegenden Gewebe befreit und entweder in 4 % F-PBS/ BOUINsches Gemisch fixiert oder in Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

5.3.2 Einbettung muriner Testes

Die entnommen Testes wurden entweder für 24 h in BOUINSches Gemisch (Bouin) bei RT oder in 4 % F-PBS bei 4 °C fixiert. Die im Bouin enthaltene Pikrinsäure dient der Erhaltung von Antigenen um daran Immunmarkierungen durchführen zu können. Des Weiteren Unterstützt Pikrinsäure das Eindringen von Formaldehyd im Gewebe und fördert dessen Färbbarkeit. Formaldehyd dient der Strukturhaltung, da es rasch das Gewebe durchdringt und fördert zudem den Erhalt von Antigenen (Mulisch *et al.*, 2010). Nach der Fixierung wurden die Testes in 70 % EtOH gewaschen und bis zur weiteren Verwendung darin gelagert. Zum Einbetten wurden die Testes in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, entfettet und in Paraffin eingebettet. Es wurde wie folgt vorgegangen:

80 % EtOH	2 h, RT
90 % EtOH	2 h, RT
96 % EtOH	2 h, RT
96 % EtOH	2 h, RT
Roti®-Histol	über Nacht, RT
Roti®-Histol	2 h, RT
Roti®-Histol/ Paraplast Plus (Paraffin) 1:1	2 h, 56 °C
Paraplast Plus (Paraffin)	minimum 5 h, 56 °C
Paraplast Plus (Paraffin)	über Nacht, 56 °C

Im Anschluss wurden die Testes in frischem Paraffin eingebettet und die Präparate bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

BOUINSches Gemisch:	0,93 % wässrige Pikrinsäure 8,8 % Formaldehydlösung 4,8 % Essigsäure
4 % F-PBS:	4 % Paraformaldehyd in PBS
PBS (pH7,4):	137 mM Natriumchlorid 2,7 mM Kaliumchlorid 8 mM Dinatriumhydrogenphosphat 1,75 mM Kaliumdihydrogenphosphat

5.3.3 Anfertigen von Paraffinschnitten

Von den gekühlten Paraffin-Präparaten wurden am Mikrotom 4 µm-Schnitte angefertigt. Diese wurden nach dem Schneiden in ein 37 °C Wasserbad zum glätten überführt. Im Anschluss wurden die Schnitte auf SuperFrost®-Objektträger gezogen, auf einer Wärmeplatte an- und über Nacht vollständig bei 37 °C getrocknet. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Präparate trocken und dunkel bei RT gelagert.

5.3.4 Hämatoxylin-Färbung nach Mayer an Paraffinschnitten

Um einen Überblick über das Gewebe zu erhalten, wurden die Präparate mit Hämatoxylin gefärbt. Hämatoxylin ist einer der am häufigsten verwendeten Kernfarbstoffe, bei der basophile Strukturen (z. B.

Zellkerne) blau-violett erscheinen. Die eigentliche Färbung erfolgt durch die Oxidation von Hämatoxylin zu Hämatein. Bei dieser Färbung kommt es zur Komplexbildung von Hämatein mit Kaliumionen, welches eine rotbraune Färbung hervorruft. Durch die Erhöhung des pH-Wertes beim bläuen mit Leitungswasser tritt die charakteristische blau-violette Farbe auf und ein Hämatoxylinlack entsteht (Mulisch *et al.*, 2010).

Die Hämatoxylin-Färbung wurde folgendermaßen durchgeführt:

Roti®-Histol	1,5 h, RT
96 % EtOH	3 Min, RT
90 % EtOH	3 Min, RT
80 % EtOH	3 Min, RT
70 % EtOH	3 Min, RT
ddH ₂ O	3 Min, RT
Hämatoxylin nach Mayer	4 Min (4 % F-PBS) oder 6 Min (Bouin), RT
fließendes Leitungswasser (bläuen)	10 Min, RT
70 % EtOH	3 Min, RT
80 % EtOH	3 Min, RT
90 % EtOH	3 Min, RT
96 % EtOH	3 Min, RT

Im Anschluss an die Hämatoxylin-Färbung wurden die Objektträger in Epon eingebettet, mit einem Deckglas versiegelt und über Nacht bei 60 °C ausgehärtet.

Epon:	51,5 % (w/v) Epon 812 28 % (w/v) Epon Härter DDSA 19 % (w/v) Epon Härter MNA 1,5 % EPON-Beschleuniger DMP 30
Saures Hämalalaun nach Mayer (1920):	3,3 mM Hämatoxylin 1 mM Natriumdiodat 105,4 mM Kaliumaluminiumsulfat 302,3 mM Chloralhydrat

5.3.5 Immunmarkierung an Paraffinschnitten

Für die Immunmarkierung wurden die Präparate für 1,5 h in Roti®-Histol entfettet und in einer absteigenden Alkoholreihe (96 %, 90 %, 80 %, 70 %, ddH₂O) für je 3 Min rehydriert. Zur Demaskierung der Epitope wurden die Präparate, je nach Angabe des Herstellers der primären Antikörper, in Citratpuffer oder Antigen Retrieval Buffer pH 6 für 21 Min zum Sieden gebracht. Zum blockieren der im Testes vorhandenen, endogenen Peroxidasen wurden die Präparate für 30 Min mit 3 % H₂O₂ inkubiert, 3 mal für je 3 Min in TBS/T gewaschen, für 30 Min in Blockinglösung blockiert und über Nacht mit den jeweiligen primären Antikörpern in Blockinglösung, bei 4 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Es wurde wieder 3 mal für 3 Min in TBS/T gewaschen, der entsprechende biotinylierte sekundäre Antikörper in Blockinglösung angesetzt, 1 h bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert und erneut 3 mal für 3 Min in TBS/T gewaschen. Zur Signalverstärkung wurde das Vectastain® Elite ABC Kit nach Herstellerangaben verwendet, die Präparate für 45 Min in einer feuchten Kammer inkubiert und erneut gewaschen (3 mal für 3 Min in TBS/T). Das Vectastain® Elite ABC Kit beruht auf dem Biotin/Avidin System wobei die hohe Affinität von Avidin zu

Biotin genutzt wird. Der im Kit enthaltene Avidin-Peroxidase-Komplex bindet an den biotinylierten, sekundären Antikörper. Die Bindung der primären Antikörper wird indirekt durch eine Färbereaktion mit DAB nach gewiesen. Die im Avidin-Peroxidase-Komplex enthaltene Peroxidase katalysiert die Reduktion von H_2O_2 , das wiederum die Oxidation von DAB auslöst, welches als schwerlösliches braunes Präzipitat ausfällt. Um die Färbereaktion zu starten wurde 0,1 % H_2O_2 zu einer 0,4 % DAB-Lösung auf die Präparate gegeben, die Färbereaktion unter dem Lichtmikroskop beobachtet und bei der gewünschten Intensität mit H_2O gestoppt. Nach der Färbereaktion wurden die Präparate 5 Min in H_2O gewaschen und je nach Fixierung für 4 Min (4 % F-PBS) oder 6 Min (Bouin) mit Hämatoxylin, zur Visualisierung der Kernstrukturen, gegen gefärbt (siehe Abschnitt 5.3.4). Nachdem für 10 Min unter fließendem Leitungswasser gebläut wurde, wurden die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 80 %, 90 %, 96 %) für je 3 Min dehydriert, in Epon mit einem Deckglas eingebettet und über Nacht bei 60 °C auspolymerisiert.

Antigen Retrieval Buffer pH 6:	9,9 mM Natriumcitrat 0,5 % Tween 20
Blockinglösung für IHC:	1,5 % BSA in TBS/T
Citratpuffer:	1,4 mM Zitronensäure 6,8 mM Natriumacetat
10 % DAB:	10 mg/ml in H_2O
Epon:	51,5 % (w/v) Epon 812 28 % (w/v) Epon Härter DDSA 19 % (w/v) Epon Härter MNA 1,5 % EPON-Beschleuniger DMP 30
3 % H_2O_2 :	3 % H_2O_2 in TBS/T
10 x TBS (pH 7,6):	0,5 M Tris 1,54 M Natriumchlorid
TBS/T:	1 x TBS 0,25 % Triton X-100

5.3.6 Klassifizierung der Stadien der murinen Spermatogenese

Klassifizierung der normalen murinen Spermatogenese erfolgte nach dem „Binary Decision Key for Staging in the Mouse“ von Meistrisch und Hess (2013). Der Keimtubulus der Maus wird dabei in 12 Stadien der Spermatogenese unterteilt, welche jeweils durch eine charakteristische Anordnung an Keimzellen definiert ist (Russell *et al.*, 1990). Es wurden jeweils die Stadien I - III, IV - VI, VII - VIII sowie IX - X in einem Bild zusammen gefasst. Nur adulte Mäuse im Alter von 12 Wochen des Stammes C57BL/6NCrl wurden in Stadien klassifiziert.

5.3.7 Klassifizierung der Stadien der humanen Spermatogenese

Die Klassifizierung der normalen Spermatogenese erfolgte nach Prinzip von Clermont (1963), das besagt, dass innerhalb eines Keimtubulus eines der von ihm beschriebenen sechs Stadien der Spermatogenese durch die charakteristische Anordnung von Keimzellen identifiziert werden sollte. Ein Patient wurde mit normaler Spermatogenese (NSP) klassifiziert, wenn den meisten Keimtubuli eines der sechs Stadien von Clermont zugewiesen werden konnte (Bergmann, 2009). Mit Hypospermatogenese (HYP) wurden Patienten klassifiziert deren Anzahl an elongierten Spermatiden reduziert und die Zusammensetzung der Keimzellen im Keimtubuli unvollständig war (Johnson *et al.*, 1992).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Immunmarkierungen an Patienten mit klassifizierter NSP und HYP durchgeführt. Es konnte kein Unterschied in der Immunmarkierung zwischen den Patienten festgestellt werden. In dieser Arbeit wurden jeweils nur die ersten fünf der sechs humanen Stadien untersucht (Stadien I - V) zudem wurden die Stadien I und II immer in einem Bild zusammen gefasst.

6 Ergebnisse

Zu Beginn der Arbeit wurde in Bezug auf *Drosophila melanogaster* postuliert, dass der PRC1 die Transkription der post-meiotisch-relevanten Gene bis zum Stadium der Spermatozyte reprimiert. Durch die tTAF abhängige Rekrutierung des PRC1 zum Nukleolus der Spermatozyten soll die Repression dieser Gene aufgehoben werden (Chen *et al.*, 2005; White-Cooper *et al.*, 2011). Bei diesem Prozess sollen die tTAFs nicht nur an der Entfernung des PRC1 vom Promotor post-meiotisch relevanter Gene, sondern auch an der Transkriptionsinitiation dieser Gene beteiligt sein. Es wurde zudem gezeigt, dass in *Drosophila*-Testes das testisspezifische BRD-Protein tBRD-1 in Spermatozyten teilweise mit tTAFs, TAF1 und Polycomb sowie mit tBRD-2 und tBRD-3 kolokalisiert (Leser *et al.*, 2012; Theofel *et al.*, 2014). Zusätzlich konnte belegt werden, dass tBRD-1 in der Lage ist, mit tBRD-2, tBRD-3 und den tTAFs zu interagieren. Es wurde postuliert, dass der tBRDs/tTAFs-Komplex mit acetyliertem Chromatin interagiert und dadurch transkriptionsaktivierende Proteine zum Chromatin rekrutiert. Dieser Schritt soll letztendlich die Transkription dieser Gene einleiten (Theofel *et al.*, 2014).

In dieser Arbeit sollte zum einem überprüft werden, ob PRC1 und PRC2 im Säugerhoden vorkommen, zum anderen, ob neben den bekannten klassischen BRD-Proteinen (BRD1, BRD2, BRD3, BRD4, BRDT) weitere klassische BRD-Proteine (BRD7, BRD8, BRD9) in Testes von *Mammalia* existieren. Weitere Analysen sahen vor die zelluläre Expression dieser BRD-Proteine in Testes zu untersuchen.

Ziel war es, durch Vergleiche der zellulären Expression der BRD-Proteine mit BRDT und Markern für die Transkription sowie den Histon-Protamin-Wechsel Hinweise auf die mögliche Funktionen dieser BRD-Proteine während der Spermatogenese zu erhalten.

6.1 Die Transkripte der klassischen BRD-Proteine sowie der klassischen PRC1/2-Untereinheiten werden in murinen Testes synthetisiert

Zur Evaluation der BRD-Proteine und PRC-Untereinheiten wurden spezifische Primer konstruiert (siehe Abschnitt 4.6) und mittels RT-PCR an adulter muriner, testikulärer Gesamt-RNA getestet. Die spezifischen Primer wurden so konzipiert, dass jeweils ein Produkt von ~350 bp amplifiziert werden konnte. Für alle analysierten BRD-Transkripte (*Brd1* - 9), PRC1-Untereinheiten (*Ring1*, *Cbx2*, *Cbx8*, *Bmi1*, *Scmh1*) sowie PRC2-Untereinheiten (*Suz12*, *Eed*, *Ezh2*) konnte ein Amplifikat der Länge von ~350 bp synthetisiert werden. Stellvertretend für die durchgeführten Transkriptnachweise ist ein Gelbild der analysierten Untereinheiten des PRC1 und PRC2 dargestellt (siehe Abbildung 10). Für die klassischen PRC1-Untereinheiten *Scmh1*, *Cbx2*, *Cbx8*, und *Ring1* konnte jeweils ein Produkt der Länge von ~350 bp amplifiziert werden. Bei *Cbx2* und *Cbx8* ist ein zusätzliches Produkt der Länge von ~100 bp sichtbar. Auch für die PRC2-Untereinheiten *Suz12*, *Eed* und *Ezh2* konnte ein Produkt der Länge von ~350 bp synthetisiert werden. Die Richtigkeit der RT-PCR-Produkte wurde mittels Sequenzierung durch die Firma LGC Genomics GmbH (Berlin) überprüft.

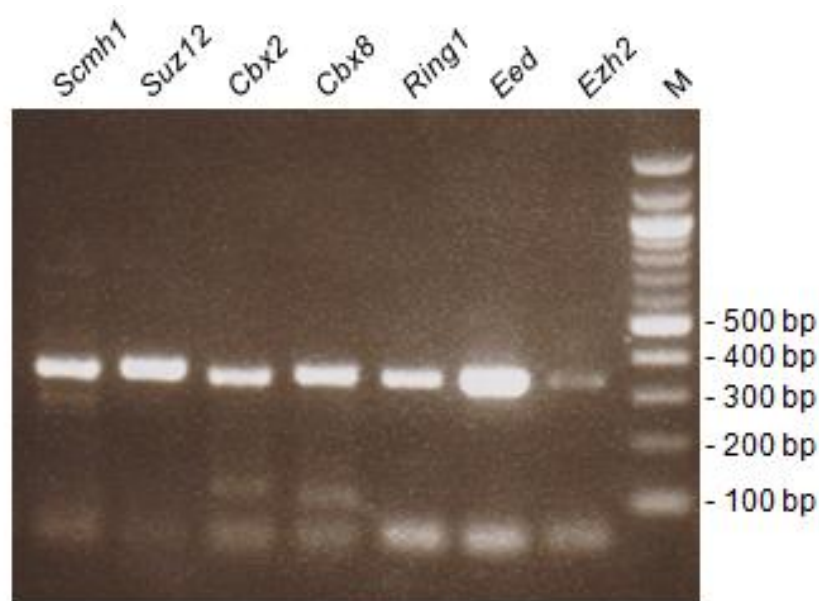


Abbildung 10: Repräsentativer Transkriptnachweis von PRC-Untereinheiten

RT-PCR mit spezifischen Primer für die Untereinheiten des PRC1 (*Scmh1*, *Cbx2*, *Cbx8*, *Ring1*) und PRC2 (*Suz12*, *Eed*, *Ezh2*). Verwendet wurde Gesamt-RNA aus adulten Mäusetestes. Die spezifischen Primer wurden immer auf eine Produktlänge von ~350 bp konzipiert. Für alle Transkripte konnte ein Amplifikat der Länge von ~350 bp nachgewiesen werden.

Somit konnten die Transkripte von *Brd1* - 9, *Ring1*, *Cbx2*, *Cbx8*, *Bmi1*, *Scmh1* (PRC1-Untereinheiten) sowie *Suz12*, *Eed*, *Ezh2* (PRC2-Untereinheiten) in Testes von Mäusen nachgewiesen werden.

6.2 Analyse juveniler muriner Testes mit unterschiedlicher Keimzellzusammensetzungen

Nachdem die Transkripte der analysierten PRC-Untereinheiten sowie der BRD-Proteine im Mäusetestis nachgewiesen wurden sollte herausgearbeitet werden, in welchen Keimzellen diese Transkripte exprimiert sind und ob sich das Transkriptniveau im Laufe der Differenzierung von der Spermatogonie zur Spermatide verändert. In diesem Sinne wurden juvenile Mäuse zu unterschiedlichen Zeitpunkten der ersten Welle der Spermatogenese untersucht. Auf diese Weise erhält man Testes mit einer entwicklungsspezifischen Zusammensetzung an Keimzellen. Betrachtet man die erste Welle der Spermatogenese, lässt sich diese wie bereits beschrieben (siehe Kapitel 2.2) in mehrere Phasen unterteilen: Die prä-meiotische Phase (Proliferationsphase), meiotische Phase und post-meiotische Phase. In den ersten Tagen nach der Geburt (die erste prä-meiotische Phase) besteht der murine Testes aus Gonozyten, Spermatogonien und Sertoli-Zellen. Im Alter von ~11 dpp (days post partum) entstehen zum ersten Mal Spermatozyten und die meiotische Phase wird eingeleitet. Das bedeutet, ab dem Alter von ~11 dpp besitzen Mäuse Spermatogonien und Spermatozyten als Keimzellen. Die post-meiotische Phase beginnt ab ~21 dpp, da ab diesem Alter zum ersten Mal zu den Spermatogonien und Spermatozyten frühe Spermatiden auftreten (Schultz *et al.*, 2003). Zur Untersuchung der Transkripte in verschiedenen Keimzellen wurden Testes in der prä-meiotischen, meiotischen und post-meiotischen Phase benötigt. Diese wurden an den Tagen 5, 7, 16, 22 und 25 den

molekularbiologischen Tests zugeführt, wobei folgende Markergene mittels RT-PCR zu ermitteln waren: *Sox9* für Sertoli-Zellen; *Zbtb16* für undifferenzierte Spermatogonien; *C-Kit* für differenzierte Spermatogonien; *Sycp3* für Spermatozyten; *Cpa6* für frühe Spermatiden und *Prm2* für späte Spermatiden. Als Kontrolle dienten β -Aktin spezifische Primer, da β -Aktin in allen Keimzellen exprimiert wird (siehe Anhang C).

Die Transkripte von *Sox9* und *Zbtb16* konnten in Testes jeden Alters nachgewiesen werden (siehe Tabelle 5), *C-Kit* sowie *Sycp3* jedoch nicht in 5 dpp-Testes. Im Vergleich dazu waren die Transkripte für *Cpa6* und *Prm2* nur in Testes von 22 dpp und 25 dpp detektierbar (siehe Tabelle 5). Ein repräsentatives Gelbild der durchgeführten RT-PCRs ist in Anhang B dargestellt. Zusätzlich zu den RT-PCRs wurden die juvenilen Testes aller Alter histologisch aufbereitet. Paraffinschnitte wurden angefertigt und diese mittels Hämatoxylin-Färbung auf ihre Keimzellenzusammensetzung hin analysiert (laufende Doktorarbeit Elisabeth Klaus, Philipps-Universität Marburg, bisher unveröffentlichte Daten).

Tabelle 5: Übersicht aller RT-PCRs für spezifische Marker von Keimzellen an unterschiedlich alten murinen Testes
+, Transkript nachweisbar; -, Transkript nicht nachweisbar

Spezifische Markergene	5 dpp	7 dpp	16 dpp	22 dpp	22 dpp
β -Aktin	+	+	+	+	+
<i>Sox9</i> (Sertoli-Zellen)	+	+	+	+	+
<i>Zbtb16</i> (undifferenzierte Spermatogonien)	+	+	+	+	+
<i>C-kit</i> (differenzierte Spermatogonien)	-	+	+	+	+
<i>Sycp3</i> (Spermatozyten)	-	+	+	+	+
<i>Cpa6</i> (frühe Spermatiden)	-	-	-	+	+
<i>Prm2</i> (späte Spermatiden)	-	-	-	+	+

Aufgrund der Resultate aus den RT-PCRs und den histologischen Untersuchungen wurden für die prä-meiotische Phase 7 dpp-Testes, für die meiotische Phase 16 dpp-Testes und für die post-meiotische Phase 25 dpp-Testes ausgewählt (siehe Abbildung 11).

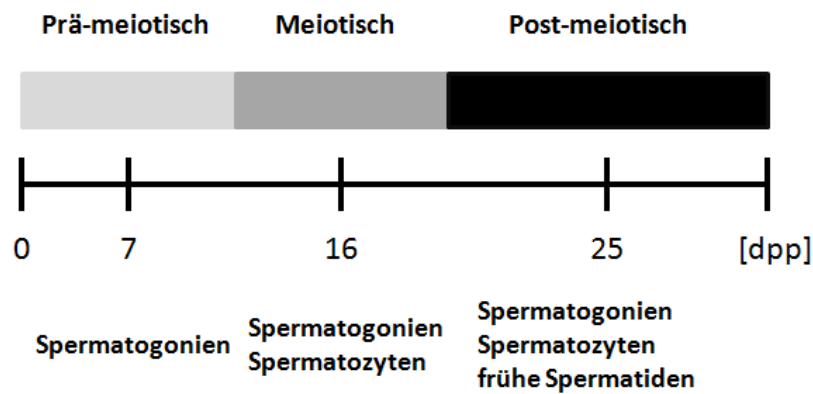


Abbildung 11: Schematische Darstellung der murinen Keimzellenzusammensetzung juveniler Testes im Alter von 7 dpp, 16 dpp und 25 dpp

Murine Testes im Alter von 7 dpp befinden sich in der prä-meiotischen Phase und besitzen Spermatogonien. Im Alter von 16 dpp ist die meiotische Phase bereits erreicht und zu den Spermatogonien treten Spermatozyten auf. In der post-meiotischen Phase der 25 dpp-Testes sind zudem noch frühe Spermatiden in den Keimtubuli vorhanden. dpp, days post partum.

6.3 Eine Vielzahl an Transkripten der Bromodomänen-Proteine sind in meiotischen und post-meiotischen Keimzellen von Mäusen angereichert

Aufgrund des in Abschnitt 6.2 beschriebenen Modells juveniler muriner Testes mit unterschiedlicher Keimzellenzusammensetzung war es nun möglich, sowohl die BRD-Proteine als auch die einzelnen PRC-Untereinheiten auf Transkriptionsunterschiede hin zwischen den Keimzellen zu untersuchen. Hierzu wurde Gesamt-RNA aus jeweils drei murinen Testes je Alter (7 dpp, 16 dpp, 25 dpp) isoliert und daraus cDNA synthetisiert. An den synthetisierten cDNAs wurden qPCRs mit spezifischen Primern für die einzelnen PRC-Untereinheiten und BRD-Proteine durchgeführt. Die Primer waren so gewählt, dass möglichst alle vorhergesagten Isoformen amplifiziert werden konnten. Als Kontrollen wurden die Reaktionen mit RNA und H₂O statt cDNA angesetzt. Als Haushaltsgen zur Normalisierung diente β -Aktin (Gaucher *et al.*, 2012). Durch den im Reaktionsansatz enthaltenen Fluoreszenzfarbstoff SYBR®Green konnte nach jedem Zyklus der qPCR die Produktmenge gemessen und dadurch eine Aussage über die Quantität der Transkripte getroffen werden. Nach Ablauf der qPCR wurden die gemessenen Fluoreszenzwerte gegen β -Aktin normalisiert und die Expression der 7 dpp-Testes als Referenz auf Eins gesetzt. Dadurch war es möglich, das Niveau der verschiedenen Transkripte in 16- und 25 dpp-Testes miteinander zu vergleichen. Die normalisierten Messwerte wurden in MS Excel in einem XY-Diagramm geplottet und die Signifikanz der Messwerte zueinander mittels t-Test, aus dem Mittelwert, aus der Standardabweichung sowie aus der Anzahl an Wiederholungen berechnet.

Als Kontrolle für diesen Versuchsaufbau wurde zuerst eine qPCR mit einem spezifischen Primer für *Brdt* durchgeführt, da dessen mRNA-Verteilung in RT-qPCR bereits von Gaucher *et al.*, (2012) beschrieben ist. In murinen Testes zeigte sich für *Brdt* eine signifikante Anreicherung des Transkripts in meiotischen Keimzellen der 16 dpp als auch in post-meiotischen Keimzellen der 25 dpp alten Mäuse (siehe Abbildung

12A). Die Daten stehen in Einklang mit denen von Gaucher *et al.*, (2012), die ebenfalls über eine meiotische sowie post-meiotische Anreicherung von *Brdt* in murinen Testes berichten. Aufgrund der Tatsache, dass mit diesem Versuchsaufbau bereits publizierte Daten reproduziert werden konnten, wurden weitere BRD-Transkripte mit spezifischen Primern mittels qPCR analysiert. Abbildung 12B belegt diesbezüglich eine signifikante Anreicherung der Transkripte *Brd1*, *Brd2* und *Brd7* in meiotischen (16 dpp) und post-meiotischen (25 dpp) Keimzellen. Für *Brd3* und *Brd8* trifft dies nur auf 25 dpp-Testes zu (siehe Abbildung 12B).

Die Transkripte *Brd4* und *Brd9* stiegen leicht in meiotischen (16 dpp) und post-meiotischen (25 dpp) Keimzellen an (siehe Abbildung 12C), dennoch war diese Tendenz nicht ausreichend, um von signifikanten Unterschieden zu sprechen.

Die Transkripte der klassischen BRD-Proteine *Brd1*, *Brd2* und *Brd7* sind wie *Brdt* in meiotischen und post-meiotischen Keimzellen, *Brd3* und *Brd8* nur in den runden Spermatiden der 25 dpp-Testes signifikant angereichert.

6.4 Weitere Transkripte von BRD-Proteinen (*Pcaf*, *Smarca2* und *Tif1a*) sind in murinen Testes signifikant in meiotischen und post-meiotischen Keimzellen angereichert

Bisher ist nur für BRDT belegt worden, dass es in die Transkriptionsaktivierung meiotischer und post-meiotisch relevanter Gene sowie in die Restrukturierung des Chromatins während der Spermiogenese regulierend eingreift (Gaucher *et al.*, 2012; Pivot-Pajot *et al.*, 2003). Da es unwahrscheinlich ist, dass nur ein BRD-Protein in diese Prozesse involviert ist wird vermutet, dass neben *Brdt* weitere BRD-Proteine in meiotischen und post-meiotischen Stadien angereichert sind. Durch *in silico* Analysen sind in der Tat drei weitere BRD-Proteine identifiziert worden, die in post-meiotischen Keimzellen angereichert sein sollen: eine Acetyl-Transferase PCAF (P300/CBP-associated factor), SMARCA2 (SWI/SNF-related matrix-associated actindependent regulator of chromatin a2) und eine E3 Ubiquitin-Protein-Ligase TIF1 α (Transcriptional intermediaryfactor 1) Database“ (Connolly *et al.*, 2009). Für TIF1 α ist belegt, dass dessen Transkripte in murinen Testes vermehrt vorliegen und das Protein im Nukleus von Spermatogonien bis hin zu elongierten Spermatiden exprimiert wird (Niederreither *et al.*, 1999). Laut dem Autor Chi (2004) ist SMARCA2 in adulten Mäusen abundant in somatischen Zellen exprimiert und an diversen Prozessen innerhalb der gewebespezifischen Genregulation beteiligt. Zudem ist die Proteinexpression im Mäusehoden bereits beschrieben. SMARCA2 wird im Nukleus der pachytänen Spermatozyten bis hin zu den runden Spermatiden exprimiert (Wang *et al.*, 2012). Auch sind SMARCA2-„knockout“-Mäuse fertil (Reyes *et al.*, 1998). Von PCAF ist nichts im Säugertestis bekannt.

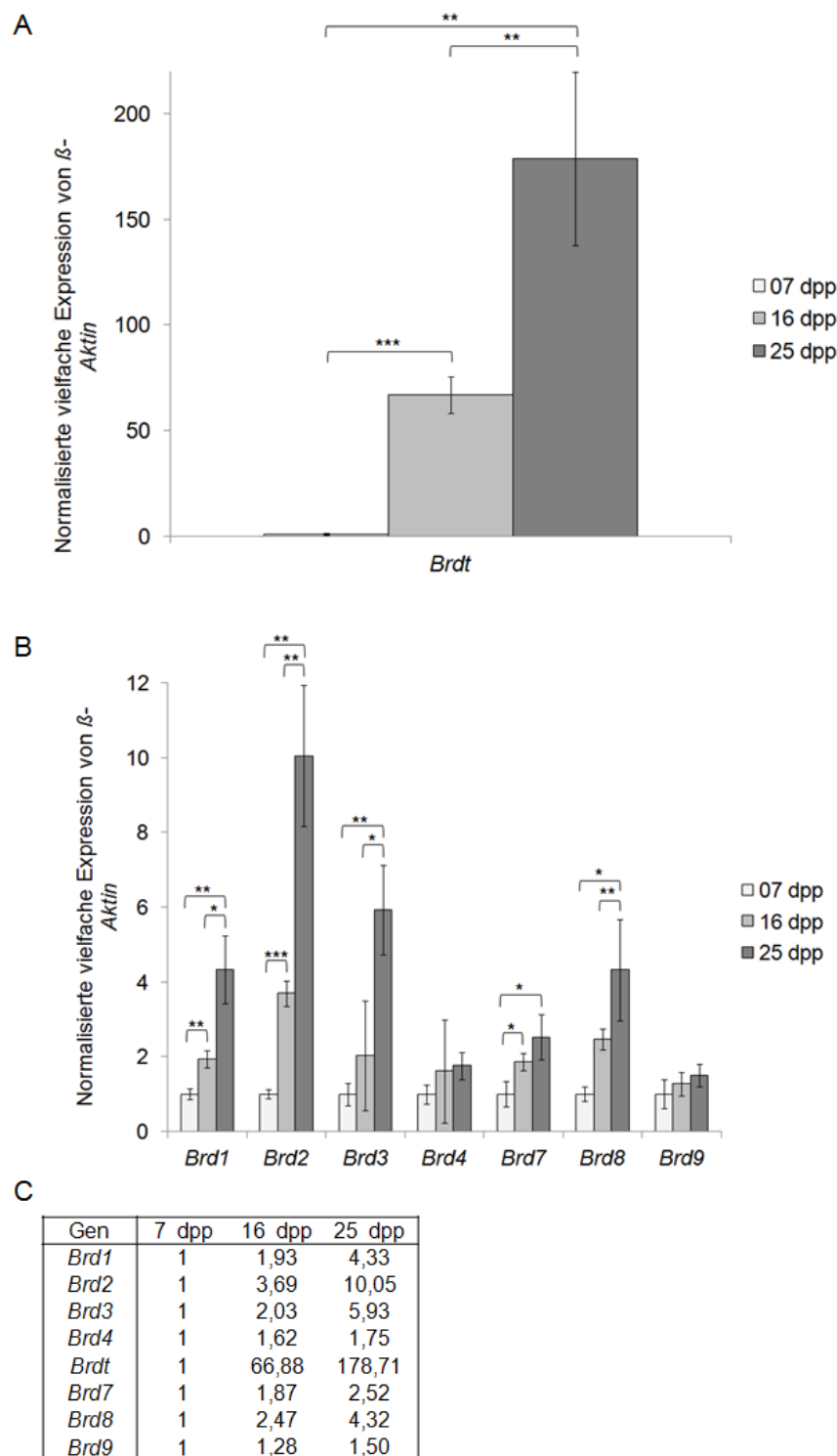


Abbildung 12: In Mäusehoden sind einige BRD-Transkripte in meiotisch und post-meiotischen Keimzellen signifikant angereichert

Die Transkripte verschiedener BRD-Proteine wurden mittels qPCR an muriner cDNA im Alter von 7, 16 und 25 dpp untersucht und gegen β -Aktin normalisiert. Als Referenz wurde die Expression der 7 dpp-Testes auf 1 gesetzt. Die Signifikanz wurde mittels t-Test berechnet, wobei die gängigen Parameter für die Signifikanz verwendet wurden: * $\leq 0,05$; ** $\leq 0,01$; *** $\leq 0,001$. (A) *Brdt* ist meiotisch (16 dpp) als auch post-meiotisch (25 dpp) während der Spermatogenese signifikant angereichert. (B) Die Transkripte der klassischen BRD-Proteine *Brd1*, *Brd2* und *Brd7* sind wie *Brdt* in meiotischen und post-meiotischen Keimzellen signifikant angereichert. *Brd3* und *Brd8* sind nur in 25 dpp-Testes signifikant angereichert. (C) Zusammenfassung der gegen β -Aktin normalisierten Expressionswerte der analysierten BRD-Proteine. Als Referenz wurde die Expression in den 7 dpp Testes auf 1 gesetzt. Alle Werte in 16 dpp und 25 dpp-Testes über 1 bedeuten einen Anstieg der Expression des Gens im Vergleich zu der Expression in Spermatogonien.

Um die (mögliche) Expression von *Pcaf*, *Smarca2* und *Tif1a* in murinen meiotischen und post-meiotischen Keimzellen zu untersuchen, wurden qPCRs durchgeführt. Für die Transkripte von *Pcaf*, *Smarca2* und *Tif1a* konnte eine signifikante Anreicherung in den post-meiotischen (25 dpp) und für *Pcaf* zusätzlich in den meiotischen (16 dpp) Keimzellen gezeigt werden (siehe Abbildung 13A). Im Vergleich zu *Pcaf* und *Smarca2* war in meiotischen (16 dpp) Keimzellen die Transkriptmenge für *Tif1a* leicht reduziert (nicht signifikant). Eine tabellarische Übersicht über die gemessene und gegen β -Aktin normalisierte Expression von *Tif1a*, *Pcaf* und *Smarca2* befindet sich in Abbildung 13B.

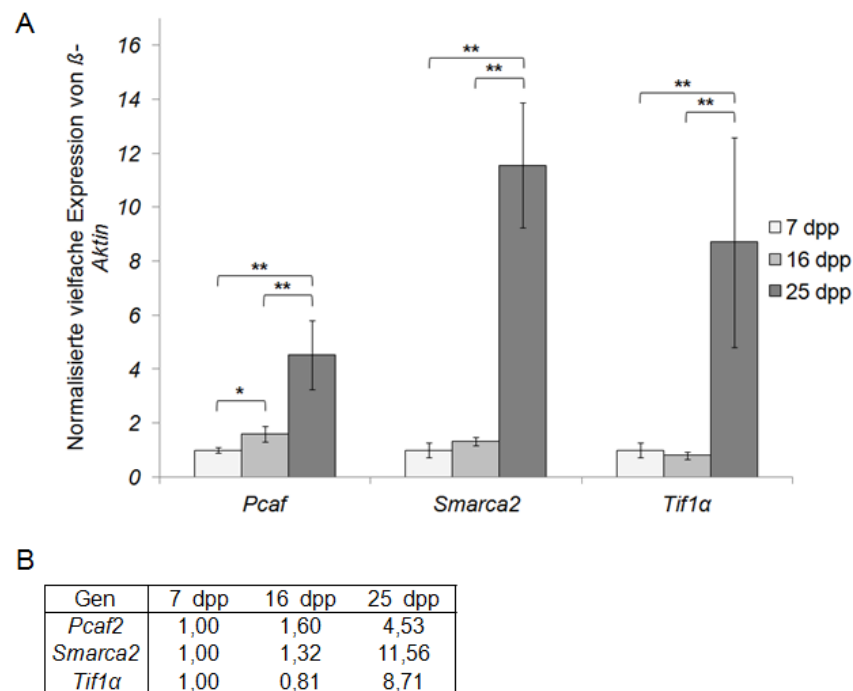


Abbildung 13: Die Transkripte *Pcaf*, *Smarca2* und *Tif1a* sind signifikant in post-meiotischen Keimzellen angereichert

Die Transkripte der BRD-Proteine *Pcaf*, *Smarca2* und *Tif1a* wurden mittels qPCR an muriner cDNA im Alter von 7, 16 und 25 dpp untersucht und gegen β -Aktin normalisiert. Als Referenz wurde die Expression der 7 dpp-Testes auf 1 gesetzt. Die Signifikanz wurde mittels t-Test berechnet, wobei die gängigen Parameter für die Signifikanz verwendet wurden: $* \leq 0,05$; $** \leq 0,01$; $*** \leq 0,001$. (A) *Pcaf* und *Smarca2* sind signifikant in post-meiotischen (25 dpp) Keimzellen angereichert. Für *Pcaf* konnte zusätzlich ein signifikanter Anstieg des Transkripts in meiotischen (16 dpp) Keimzellen beobachtet werden. *Tif1a* zeigt einen leichten Transkriptabfall in meiotischen (nicht signifikant) und einen signifikanten Anstieg in post-meiotischen Keimzellen. (B) Zusammenfassung der gegen β -Aktin normalisierten Expressionswerte der analysierten BRD-Proteine. Als Referenz wurde die Expression in den 7 dpp Testes auf 1 gesetzt. Alle Werte in 16 dpp und 25 dpp-Testes über 1 bedeuten einen Anstieg der Expression des Gens im Vergleich zu der Expression in Spermatogonien.

Somit konnte gezeigt werden, dass *Pcaf*, *Smarca2* und *Tif1a* wie *Brdt* signifikant in meiotischen Keimzellen der 16 dpp und in post-meiotischen Keimzellen der 25 dpp-Testes angereichert sind.

6.5 Untersuchung der Proteinexpression der BRD-Proteine und PRC-Untereinheiten mittels Westernblot-Analysen

Herausgearbeitet werden sollte, ob BRD-Proteine, wie für BRDT beschrieben, an der Transkription meiotischer sowie post-meiotisch relevanter Gene und/oder an der post-meiotischen Reorganisation des Chromatins beteiligt sind. Da das Transkript von *Brdt* in diesen Keimzellen signifikant erhöht vorliegt, wurden entsprechend nur solche BRD-Proteine analysiert (BRD1, BRD2, BRD3, BRD7, BRD8, SMARCA2, PCAF, TIF1 α), die in den gleichen Keimzellen wie *Brdt* signifikant angereichert sind.

Die Thematik wurde mittels Westernblot-Verfahren evaluiert. Hierzu wurde der Gesamtproteinextrakt von murinen Testes im Alter von 12 Wochen hergestellt. Jeweils 50 μ g Gesamtproteinextrakt wurde in einer 10 % SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und diese immunologisch mit spezifischen Antikörpern gegen die BRD-Proteine und Untereinheiten der PRC inkubiert (siehe Abbildung 14). Als Kontrolle wurde ein gegen AKTIN gerichteter Antikörper eingesetzt (siehe Anhang C).

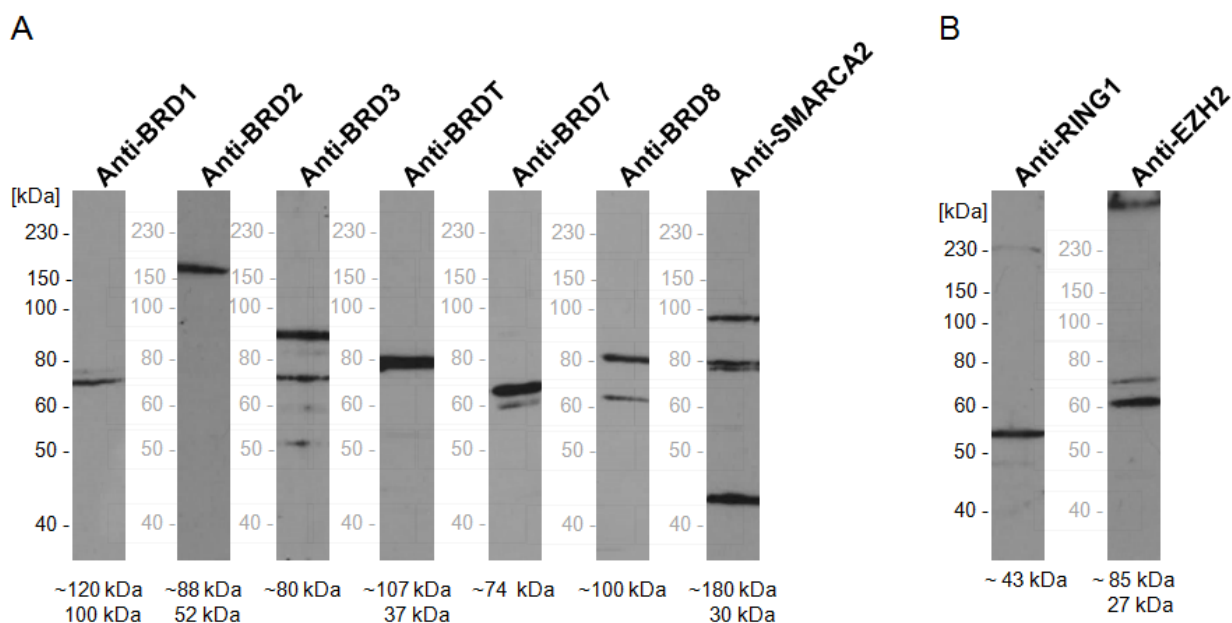


Abbildung 14: Immunoblots mit spezifischen Antikörpern gegen post-meiotisch signifikant angereicherte BRD-Proteine und den PRC-Untereinheiten RING1 und EZH2

(A) Immunoblots, markiert mit spezifischen Antikörpern gegen BRD1, BRD2, BRD3, BRDT, BRD7, BRD8 und SMARCA2. (B) Immunoblots mit spezifischen Antikörpern gegen die PRC1-Untereinheit RING1 und gegen die PRC2-Untereinheit EZH2. Verwendet wurden je 50 μ g Gesamtproteinextrakt von adulten murinen Testes. Die vorhergesagte Proteinmasse der einzelnen Isoformen, die von den verwendeten Antikörper detektiert werden, sind unter dem jeweiligen Immunoblot eingetragen.

Von den analysierten BRD-Proteinen konnte nur für BRD7 ein Signal in der vorhergesagten Größe von ca. 74 kDa detektiert werden. Eine schwache Bande zeigte sich zudem bei ~60 kDa (siehe Abbildung 14A). Bei BRD1 und BRD8 wurde jeweils eine starke und eine schwache Bande sichtbar, die jedoch nicht mit den vorhergesagten Größen der detektierbaren Isoformen übereinstimmen. BRD2 wurde als Signal bei ~200 kDa

sichtbar, das deutlich über der erwarteten Größe von ~88 kDa und 52 kDa lag. Ein anderes Muster wurde bei der Signalverteilung von BRD3, BRDT und SMARCA2 offensichtlich. Hier lagen die visualisierten Proteinbanden zwischen den erwarteten Größen der Isoformen, d. h. die Signale waren entweder kleiner oder größer als ihre potentiell detektierbaren Isoformen (siehe Abbildung 14A). Als Repräsentant des PRC1 wurde RING1, als Repräsentant des PRC2 wurde EZH2 gewählt. RING1 erschien als Signal bei ~55 kDa und lag damit nur unwesentlich über der erwarteten Größe von ~43 kDa. Für EZH2 hingegen konnten zwei Banden dargestellt werden, die nicht der erwarteten Größe der beiden Isoformen entsprachen (siehe Abbildung 14B).

Zusätzlich wurden Westernblot-Analysen an Mäusetestes im Alter von 7 dpp, 16 dpp, 25 dpp durchgeführt, um zu analysieren, in welchen Keimzellen die BRD-Proteine und PRC-Untereinheiten exprimiert sind. Stellvertretend für diese Versuche sind Immunoblots gegen BRDT beschrieben (siehe Anhang D). Hier konnten für alle drei getesteten Altersgruppen zwei dominante Signale in der Größe von ~80 kDa und ~40kDa detektiert werden. Darüber hinaus wurden weitere Signale aufgezeichnet, die zwischen den zwei dominanten Signalen lagen. Problematisch hierbei war, dass sich die Bandenaufteilung nicht reproduzieren ließ, vielmehr variierte sie versuchsabhängig. Das gleiche Problem trat auf, wenn die anderen spezifischen Antikörper verwendet wurden. Der Ansatz wurde daher nicht weiter verfolgt.

6.6 Histologischer Nachweis des zellulären Auftretens der aktiven RNA-Polymerase II CTD-P-S5, H4ac, TNP1, PRM1 und PRM2 in murinen und humanen Testes

In Abschnitt 6.3 bis 6.4 konnten die Transkripte ausgewählter BRD-Proteine in murinen Testes nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde gezeigt, wie sich das Transkriptniveau im Laufe der Differenzierung vom Spermatogonium bis zum frühen Spermatidenstadium verändert (siehe Abbildung 12 bis Abbildung 13). Um Aussagen zur Proteinverteilung in den Keimzellen treffen zu können, wurden die in Paraffin eingebetteten Präparate immunhistochemischen Analysen unterworfen.

Wie einleitend erwähnt, vermindert sich die Transkriptionsaktivität im Verlaufe der Spermatidendifferenzierung im Säugertestis (siehe Abschnitt 2.4) (Kierszenbaum *et al.*, 1975; Monesi, 1965; Utakoji, 1966). Während dieser post-meiotischen Phase wird u. a. das Chromatin kompaktiert, und zwar durch den Austausch der Histone gegen die kleineren Protamine. Voraussetzung für diesen Wechsel ist eine offene Chromatinstruktur, die auch durch die Hyperacetylierung des Histons H4 erreicht wird (Dadoue, 2003). Mit fortschreitender Kompaktierung des Chromatins werden die Histone transient durch TNP1 und TNP2 und anschließend durch PRM1 und PRM2 ersetzt (Steger, 1999). Um die genaue zelluläre Lokalisation und somit den zeitlichen Ablauf dieser Vorgänge in *Mammalia*-Testes zu ermitteln, wurden Antikörpermarkierungen gegen aktive RNA-Polymerase II CTD-P-S5 (aRNA-Pol II), H4ac, TNP1, PRM1 und PRM2 durchgeführt (siehe Abbildung 15 und 16). Der Vergleich der zellulären Lokalisation dieser Proteine mit derjenigen der BRD-Proteine sollte Hinweise darauf geben, an welchen Prozessen sie während der

Spermatogenese, der Transkription oder an dem Histon-Protamin-Wechsel, beteiligt sind.

In Mäusen zeigte die Färbung gegen aRNA-Pol II eine starke Kernmarkierung von Spermatogonien bis hin zu step 8-Spermatiden (Abbildung 15, A - C, schwarzer Doppelpfeil). In step 9 - 10-Spermatiden war die Markierung deutlich schwächer ausgeprägt (Abbildung 15, D, weiße Pfeilspitze). In step 11-Spermatiden war aRNA-Pol II nicht mehr zu detektieren ist (Abbildung 15, E). Im Unterschied dazu war aRNA-Pol II im humanen Testis vom Kern der Spermatogonien bis hin zu step 3-Spermatiden nachweisbar (Abbildung 16, A - B, schwarzer Doppelpfeil), nicht mehr jedoch ab step 4-Spermatiden. Es lässt sich festhalten, dass die aRNA-Pol II in Mäusen und Menschen von den Spermatogonien bis hin zu den runden Spermatiden vorliegt.

H4ac tritt im murinem Testis von step 9 - 10 bis step 12-Spermatiden auf (Abbildung 15, J - L, weiße Pfeilspitze) und ist ab step 13 nicht mehr zu sehen. Eine leichte Markierung im Kern der Spermatogonien und runden Spermatiden ist von Stadium IV bis VI (Abbildung 15, H) sichtbar, nicht auszuschließen ist allerdings eine unspezifische Hintergrundfärbung. Gefärbt waren im humanem Testis nur die Nuklei der step 4-Spermatiden (Abbildung 16, G, weiße Pfeilspitze). Auch hier ergab sich eine dezente Hintergrundfärbung im Zytoplasma aller Keimzellen (Abbildung 16, E - H). Insgesamt weist die Markierung gegen H4ac in beiden Spezies eine starke Kernfärbung in gerade elongierten Spermatiden auf.

Der Antikörper gegen TNP1 evozierte ein Farbsignal im Nukleus muriner Keimzellen von step 9 - 10 bis step 13 - 14-Spermatiden (Abbildung 15, M, P - R, weiße Pfeilspitze). Einschränkend ist anzufügen, dass in step 13 - 14-Spermatiden das Signal zwischen Kern und Zytoplasma verschwamm, d. h. die Grenzen zwischen dem Nukleus und Zytoplasma waren aufgrund der Färbung nicht immer klar zu erkennen. In menschlichen Keimzellen war TNP1 nur im Kern von step 4-Spermatiden nachweisbar (Abbildung 16, K, weiße Pfeilspitze). In step 5-Spermatiden war die Färbung negativ, auffallend war lediglich eine leichte zytoplasmatische Markierung (Abbildung 16, weiße Pfeilspitze). Die vorliegenden Daten demonstrieren das Vorhandensein von H4ac in gerade elongierten Spermatiden im murinem und humanem Testis, analog zu TNP1. Offensichtlich treten beide Proteine erst nach aRNA-Pol II in den Keimzellstadien auf (Mäuse: step 9 - 10, Mensch: step 4).

PRM1 war in der Maus als nukleäres Signal ab step 13 - 14 (Abbildung 15, S - U, weiße Pfeilspitze), PRM2 erst ab step 15 (Abbildung 15, b - c, weiße Pfeilspitze) detektierbar. Beide Proteine waren jedoch darüber hinaus auch in den Spermatozoa der step 16 Spermatiden zu sehen (Abbildung 15, U, c). Im Gegensatz dazu konnten im humanen Testis PRM1 und PRM2 nur in step 7 - 8-Spermatiden visualisiert werden (Abbildung 15, M, Q, weiße Pfeilspitze). Auch hier wurde in beiden Spezies für PRM1 und PRM2 eine Ausweitung des Farbsignals bis ins Zytoplasma dieser Spermatiden beobachtet.

Die Immunmarkierung gegen Protamin 1 und Protamin 2 überlappten sich zum Teil in murinen Testes, in humanen Testes waren die Anfärbungen in ihrer Verteilung identisch. Im Mäusehoden überlappte das Signal von PRM1 mit TNP1 in step 13 - 14-Spermatiden. Neben diesem treten humanes PRM1 (hPRM1), hPRM2 und murines PRM2 (mPRM2) erst dann im Testis auf (Mäuse: step 15, Menschen: step 7 - 8),

nachdem H4ac und TNP1 nicht mehr nachweisbar sind.

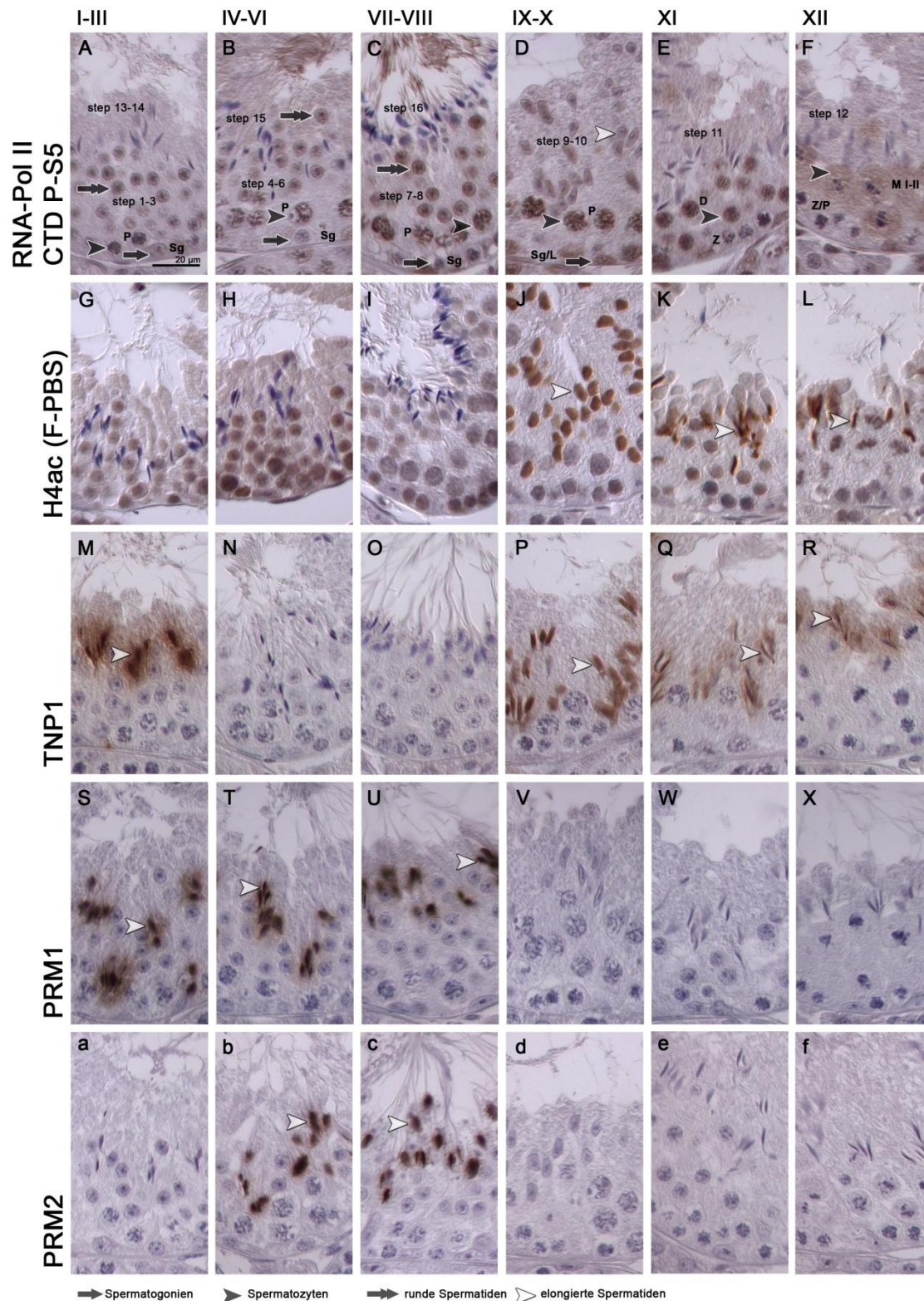


Abbildung 15: Immunmarkierung an murinen Testes mit Markern für die Transkription und den Histon-Protamin-Wechsel

Adulte murine testikuläre Paraffinschnitte wurden mit Antikörpern gegen aktive RNA-Polymerase II (A - F), H4ac (G - L), TNP1 (M - R), PRM1 (S - X) und PRM2 (a - f) markiert. Die Präparate der H4ac wurden in 4 %F-PBS, die restlichen Präparate in Bouin fixiert. Nach der Immunmarkierung wurden die Zellkerne mit Hämatoxylin gefärbt. Die römischen

Zahlen (I - XII) repräsentieren das Stadium des Keimepithels während der Spermatogenese. Die arabischen Ziffern (step 1 - 16) geben das Stadium der Spermatiden im Verlauf der Spermiogenese an. Spermatogonien (Sg), leptotäne Spermatozyten (L), zygoten Spermatozyten (Z), pachytäne Spermatozyten (P), diplotäne Spermatozyten (D), Phasen der ersten/zweiten meiotischen Teilung (M I - II).

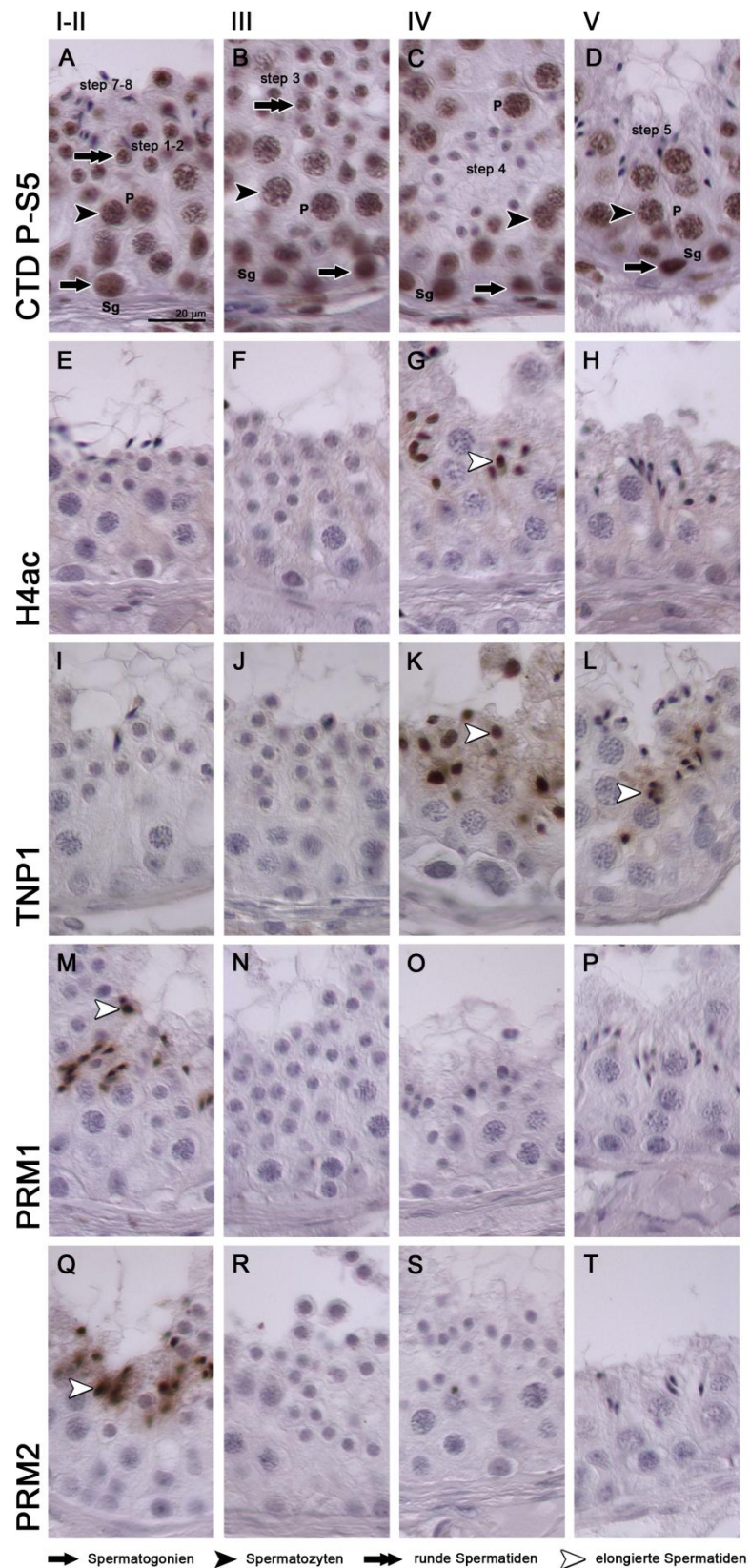


Abbildung 16: Immunmarkierung an humanen Testes mit Markern für die Transkription und dem Histon-Protamin-Wechsel

Humane Paraffinpräparate wurden mit Antikörpern gegen aRNA-Pol II (A - D), H4ac (E - H), TNP1 (I - L), PRM1 (M - P) und PRM2 (Q - T) markiert. Alle Präparate wurden in Bouin fixiert. Die Immunmarkierung ist als braunes Präzipitat sichtbar. Nach der Immunmarkierung wurden die Zellkerne mit Hämatoxylin gefärbt. Die römischen Zahlen (I - XII) repräsentieren das Stadium des Keimepithels während der Spermatogenese. Die arabischen Ziffern (step 1 - 8) geben das Stadium der Spermatiden im Verlauf der Spermiogenese an. Spermatogonien (Sg), leptotäne Spermatozyten (L), zygoten Spermatozyte (Z), pachytäne Spermatozyten (P).

6.7 In humanen und murinen Testes überschneidet sich die Expression der BRD-Proteine (mBRD2, BRDT, BRD8, mTIF1α) mit dem Auftreten von aktiven RNA-Polymerase II

Im vorherigen Abschnitt (siehe Abschnitt 6.6) wurde dargelegt, in welchen Keimzellen noch Transkription (aRNA-Pol II) stattfindet, wann der Histon-Protamin-Wechsel beginnt (H4ac) und wann die Histone gegen Transitionsproteine und anschließend gegen Protamine ausgetauscht werden. Der folgende Abschnitt beschreibt die immunhistologische Auswertung der Expression der meiotisch und post-meiotisch angereicherten BRD-Proteine in Maus und Mensch. Das Expressionsmuster wurde mit dem Marker für die Transkription und den Histon-Protamin-Wechsel verglichen, um Hinweise auf die mögliche Funktion dieser Proteine zu erhalten.

BRD2 war im Nukleus muriner Keimzellen von Spermatogonien (Abbildung 17, A, schwarzer Pfeil) bis hin zu step 9 – 10-Spermatiden (Abbildung 17, D, weiße Pfeilspitze) detektierbar, wobei die Farbreaktion in den letzteren Keimzellen schwächer ausgeprägt war. Ab step 11-Spermatiden unterblieb die Farbreaktion (Abbildung 17, E). Im Kontrast dazu konnte BRD2 im humanen Testis nur in Spermatogonien dargestellt werden (siehe Abbildung 18, A - D, schwarze Pfeilspitze). BRD2 zeigt also in Mäusen und Menschen ein komplett unterschiedliches Expressionsmuster.

BRD3 war im humanen Testes dominant in den Kernen der step 4 (Abbildung 18, G, weiße Pfeilspitze) und sehr schwach im Zytoplasma pachytäner Spermatozyten (Abbildung 18, H, schwarze Pfeilspitze) aufzufinden. Auch hier breitete sich jedoch die Färbung in das umliegende Zytoplasma der step 4-Spermatiden aus (Abbildung 17, G, weiße Pfeilspitze). In Mäusen konnte mit dem verwendeten Antikörper kein Signal erzeugt werden.

Mittels eines spezifischen BRDT-Antikörpers wurde im Mäusehoden ein starkes Kernsignal ab den pachytänen Spermatozyten (Abbildung 17, G - L, schwarze Pfeilspitze) bis hin zu step 12-Spermatiden detektiert (Abbildung 17, L, weiße Pfeilspitze). In den Spermatogonien und im weiteren Verlauf der Spermatidendifferenzierung (ab step 13 - 14) war mBRDT nicht mehr nachweisbar. In menschlichen Keimzellen wurde BRDT moderat an der Kernmembran der pachytänen Spermatozyten lokalisiert (schwaches Farbsignal; Abbildung 18, L, schwarze Pfeilspitze), gefolgt von einer intensiven Färbung in den runden Spermatiden (step 1 - 3) (Abbildung 18, I - J, schwarzer Doppelpfeil) bis hin zu den step 4-Spermatiden (Abbildung 18, K, weiße Pfeilspitze). Ab step 5-Spermatiden (Abbildung 18, L) konnte keine Farbreaktion induziert werden. Die Lokalisation von BRDT ist somit in beiden Spezies sehr ähnlich.

In murinen Keimzellen ließ sich durch den gegen BRD8 gerichteten Antikörper ein nukleäres Signal in den

pachytänen Spermatozyten (Abbildung 17, O, schwarze Pfeilspitze) bis hin zu step 8-Spermatiden erzeugen (Abbildung 17, O, schwarzer Doppelpfeil). Auffallend war die zusätzliche Färbung der Akrosomvesikel in step 1 - 3-Spermatiden, diese als kompakte runde Markierung an der Peripherie der Spermatidenkerne (Abbildung 17, M). Im humanen Testisgewebe trat die Markierung ebenfalls erst in den Kernen der pachytänen Spermatozyten auf (Abbildung 18, O, schwarze Pfeilspitze), mit einer maximalen Farbintensität in step 1 - 3-Spermatiden (Abbildung 18, M - N, schwarzer Doppelpfeil) und einer schwachen Anfärbung in Kernen der step 4-Spermatiden (Abbildung 18, O, weiße Pfeilspitze). Mit fortschreitender Differenzierung der Spermatiden (ab step 5) war hBRD8 nicht mehr zu detektieren. Als Fazit lässt sich festhalten, dass in Mäusen und Menschen die testikuläre Lokalisation von BRD8 sehr ähnlich ist.

Im Testis von Mäusen ließ sich TIF1 α den Nuklei der pachytänen Spermatozyten zuordnen (Abbildung 17, S, schwarze Pfeilspitze). Auch in den Nuklei der step 9 - 10-Spermatiden wurde eine, wenngleich schwächere Farbreaktion induziert (Abbildung 17, V, weiße Pfeilspitze). Interessant war eine dunkle kreisförmige Markierung innerhalb der Zellkerne der runden Spermatiden (step 1 - 6), das Chromozenter (Ansammlung von Heterochromatin) (Abbildung 17, S - T, schwarzer Doppelpfeil). Hinzuweisen ist ferner auf eine dezente zytoplasmatische Hintergrundfärbung in allen Keimzellen (Abbildung 17, S - X). mTIF1 α zeigt somit ein ähnliches Verteilungsmuster, wie bereits für mBRD2, mBRDT und mBRD8 beschrieben. In humanen Testes konnte mit dem Anti- TIF1 α Antikörper kein Signal erzeugt werden.

Mittels eines gegen SMARCA2 gerichteten Antikörpers konnte im Mäusehoden kein Farbsignal hervorgerufen werden. Eine positive Reaktion ergab sich jedoch in humanen testikulären Präparaten. Die Lokalisation im Kern der step 4-Spermatiden (Abbildung 18, S, weiße Pfeilspitze) entsprach dem Verteilungsmuster von hBRD3. In den übrigen Keimzellen konnte keine Färbung gegen SMARCA2 induziert werden.

Antikörper gegen BRD1 und BRD7, deren Transkripte ebenfalls in meiotischen und post-meiotischen Keimzellen signifikant angereichert sind, konnten bei Mäusen und in Menschen keine Farbsignale evozieren. Zusammenfassend lässt sich darlegen, dass die räumliche Verteilung von mBRD2, BRDT, BRD8 und mTIF1 α mit derjenigen der aRNA-Pol II im murinen und humanen Testis größtenteils übereinstimmt. Hingegen überlappt die Expression von hBRD3 und hSMARCA2 mit der hH4ac und der hTNP1 Expression im menschlichen Testes.

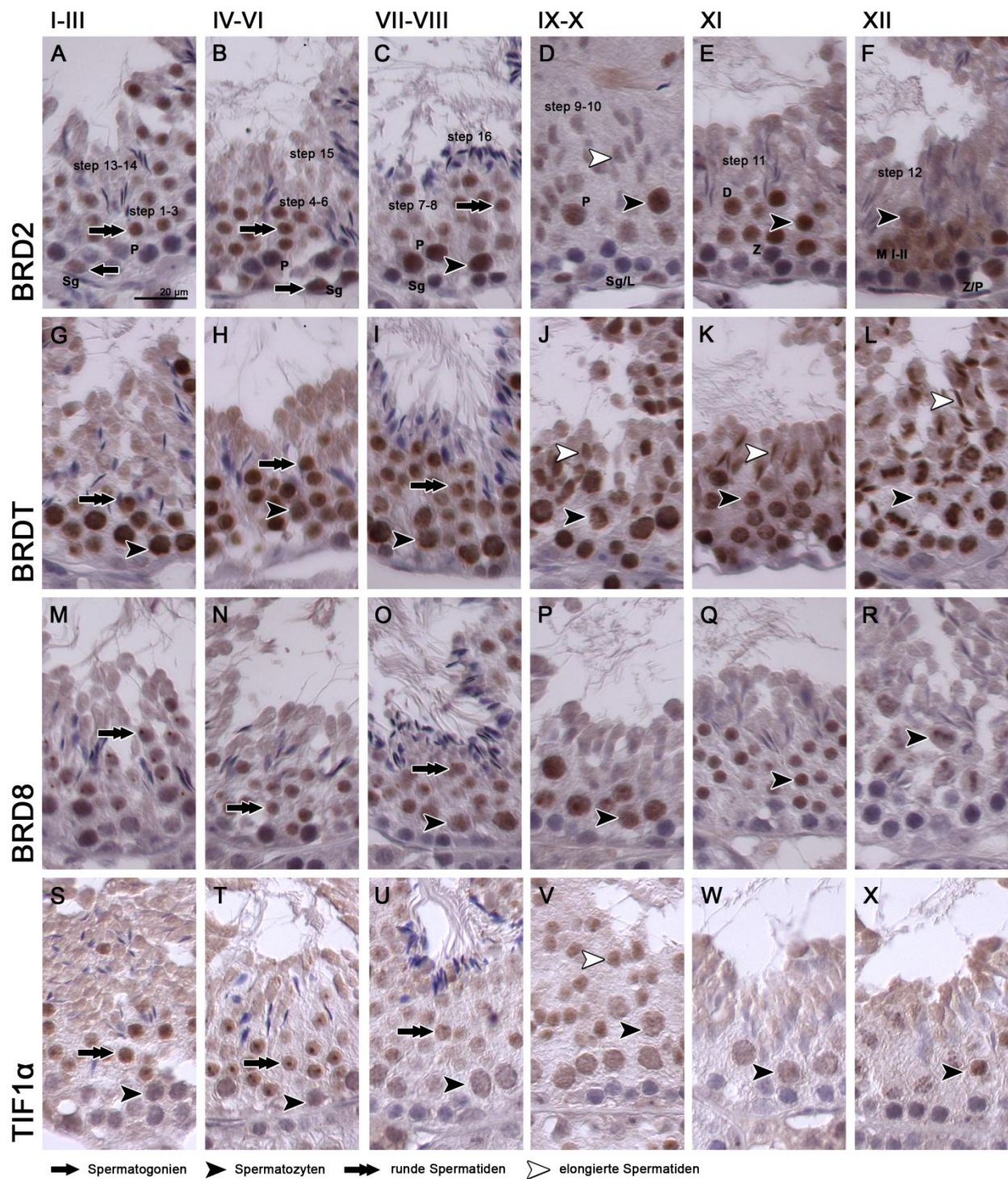


Abbildung 17: Die Expression der murinen BRD-Proteine decken sich größtenteils mit der aktiven RNA Polymerase II

Immunmarkierung an Paraffinschnitten aus dem Testis adulter Mäusen mit Antikörpern gegen BRD2 (A - F), BRDT (G - L), BRD8 (M - R) und TIF1α (S - X). Alle Präparate wurden in 4 %F-PBS fixiert. Die Immunmarkierung der spezifischen Antikörper wird als braunes Präzipitat visualisiert, die Zellkerne sind auf Grund der Hämatoxylin-Färbung blau dargestellt. Spermatogonien (Sg), leptotäne Spermatozyten (L), zygoten Spermatozyten (Z), pachytäne Spermatozyten (P), diplotäne Spermatozyten (D), Phasen der ersten/zweiten meiotischen Teilung (M I - II), Spermatiden (step 1 - 16).

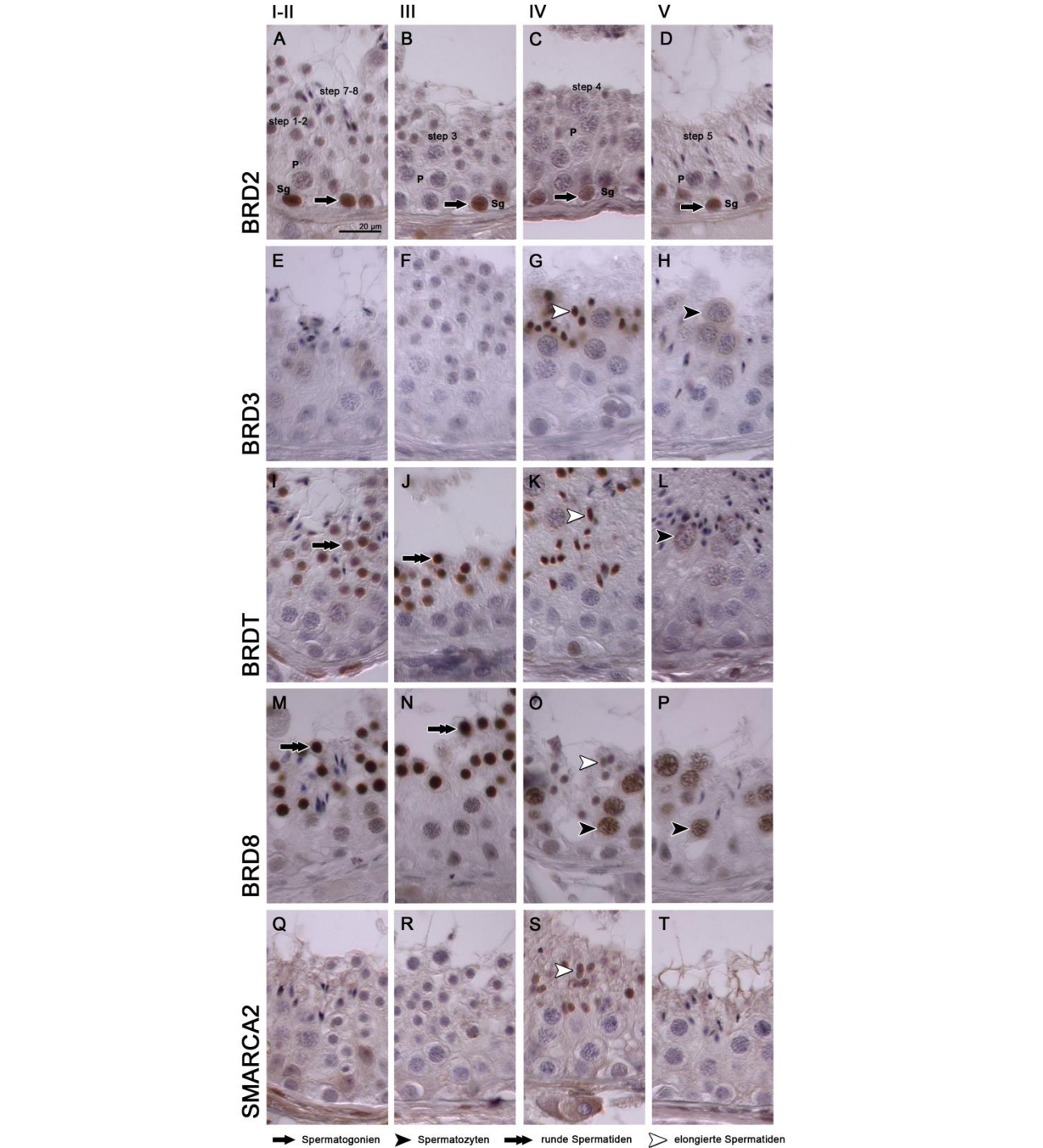


Abbildung 18: Immunfärbung der post-meiotisch angereicherten BRD-Proteine in humanen Keimzellen

Menschliche Testispräparate, markiert mit spezifischen Antikörpern gegen BRD2 (A - D), BRD3 (E - H), BRDT (I - L), BRD8 (M - P) und SMARCA2 (Q - T). Die Immunmarkierung der spezifischen Antikörper wird als braunes Präzipitat visualisiert, die Zellkerne sind auf Grund der Hämatoxylin-Färbung blau dargestellt. Spermatogonien (Sg), leptotäne Spermatozyten (L), zygoten Spermatozyten (Z), pachytäne Spermatozyten (P), Spermatozyten (step 1 - 8).

6.8 Die zelluläre Expression von EZH2 ist ähnlich zwischen murinen und humanen Testes

Bislang ist, mit Ausnahme der PRC1-Untereinheit EZH2, nicht bekannt, ob die reprimierenden Komplexe PRC1 und PRC2 mit ihren klassischen Untereinheiten im Säugertestis vorhanden sind. Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Präsenz der Transkripte einiger klassischer PRC1 und PRC2-Untereinheiten in adulten murinen Testes nachgewiesen werden (siehe Abschnitt 6.1). Um die Proteinexpression ausgewählter PRC1 (RING1, CBX2, CBX8, BMI1, SCMH1) und PRC2-Untereinheiten (EZH2, EED, SUZ12) zu ermitteln, wurden auch diese immunhistologisch mit spezifischen Antikörpern an murinen und humanen Testispräparaten untersucht.

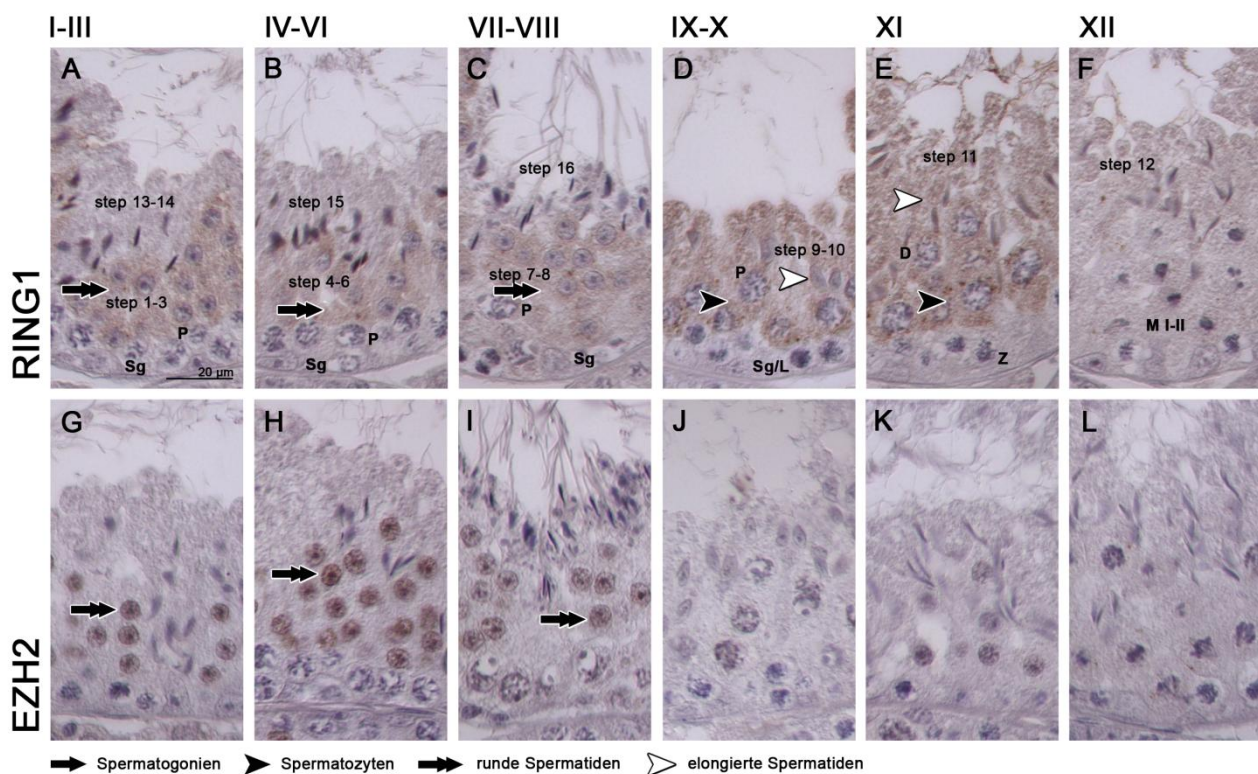


Abbildung 19: Immunmarkierung gegen RING1 und EZH2 im Mäusehoden

Murine Testispräparate mit Immunmarkierungen gegen RING1 (A - F) und EZH2 (G - L). Alle Präparate wurden in Bouin fixiert. Die Immunmarkierung ist als braunes Präzipitat sichtbar. Nach der Immunmarkierung wurden die Zellkerne mit Hämatoxylin blau gefärbt. Spermatozoen (Sg), leptotäne Spermatozyten (L), zygoten Spermatozyten (Z), pachytäne Spermatozyten (P), diplotäne Spermatozyten (D), Phasen der ersten/zweiten meiotischen Teilung (MI - II), Spermatozoen (step 1 - 16)

Im murinen Testis war RING1 als schwaches Signal im Zytoplasma der pachytänen Spermatozyten (Abbildung 19, D, schwarze Pfeilspitze) bis hin zum Stadium step 11-Spermatozoen (Abbildung 19, E, weiße Pfeilspitze) zu erkennen. Es trat keine Färbung in den Nuklei der Keimzellen auf. Dagegen war RING1 in humanen Keimzellen deutlich im Kern von step 4-Spermatozoen sichtbar (Abbildung 20, C, weiße Pfeilspitze). Zusätzlich waren die Akrosomvesikel bzw. das Akrosom der step 1 - 3 sowie step 7 - 8-Spermatozoen angefärbt (Abbildung 20, A, schwarzer Doppelpfeil, weiße Pfeilspitze). RING1 zeigt offenbar starke Unterschiede in den Expressionsmustern in humanen versus murinen Testes.

EZH2 war im Mäusehoden ausschließlich im Nukleus runder Spermatiden (step 1 bis step 8) detektierbar (Abbildung 19, G - I, schwarzer Doppelpfeil). In sämtlichen anderen Präparaten unterblieb die Färbung. Im humanen Testis konnte EZH2 in den Kernen der pachytänen Spermatozyten (Abbildung 20, G, schwarze Pfeilspitze) nachgewiesen werden, zusätzlich jedoch auch in den Kernen der step 4-Spermatiden (Abbildung 20, G, weiße Pfeilspitze).

Die verbleibenden klassischen Untereinheiten des PRC1 (CBX2, CBX8, SCMH1 und BMI1) und PRC2 (EED und SUZ12) konnten immunhistologisch nicht untersucht werden, da die Antikörper für diese Anwendung nicht geeignet waren.

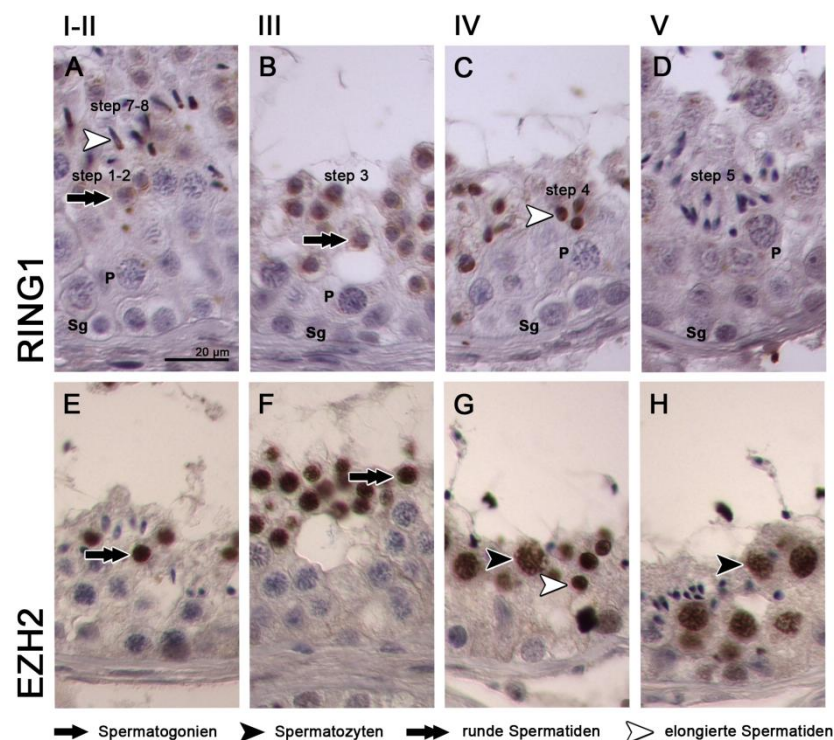


Abbildung 20: Expression von RING1 und EZH2 im humanen Testes

Humane Testispräparate, die gegen RING1 (A - D) und EZH2 (E - H) markiert wurden. Alle Präparate wurden in Bouin fixiert. Die Immunmarkierung ist als braunes Präzipitat sichtbar. Nach der Immunmarkierung wurden die Zellkerne mit Hämatoxylin blau gefärbt. Spermatogonien (Sg), leptotäne Spermatozyten (L), zygoten Spermatozyte (Z), pachytäne Spermatozyten (P), Spermatiden (step 1 - 8).

6.9 Die Transkripte der PRC Untereinheiten *Ring1*, *Bmi1*, *Scmh1* und *Ezh2* sind in post-meiotischen Keimzellen signifikant angereichert

Nachdem im vorherigen Abschnitt die Proteinexpression von RING1 und EZH2 ermittelt wurde, sollte untersucht werden, ob die Transkriptverteilung mit der beobachteten Proteinexpression korreliert. Dazu wurden qPCRs an muriner cDNA unterschiedlichen Alters durchgeführt.

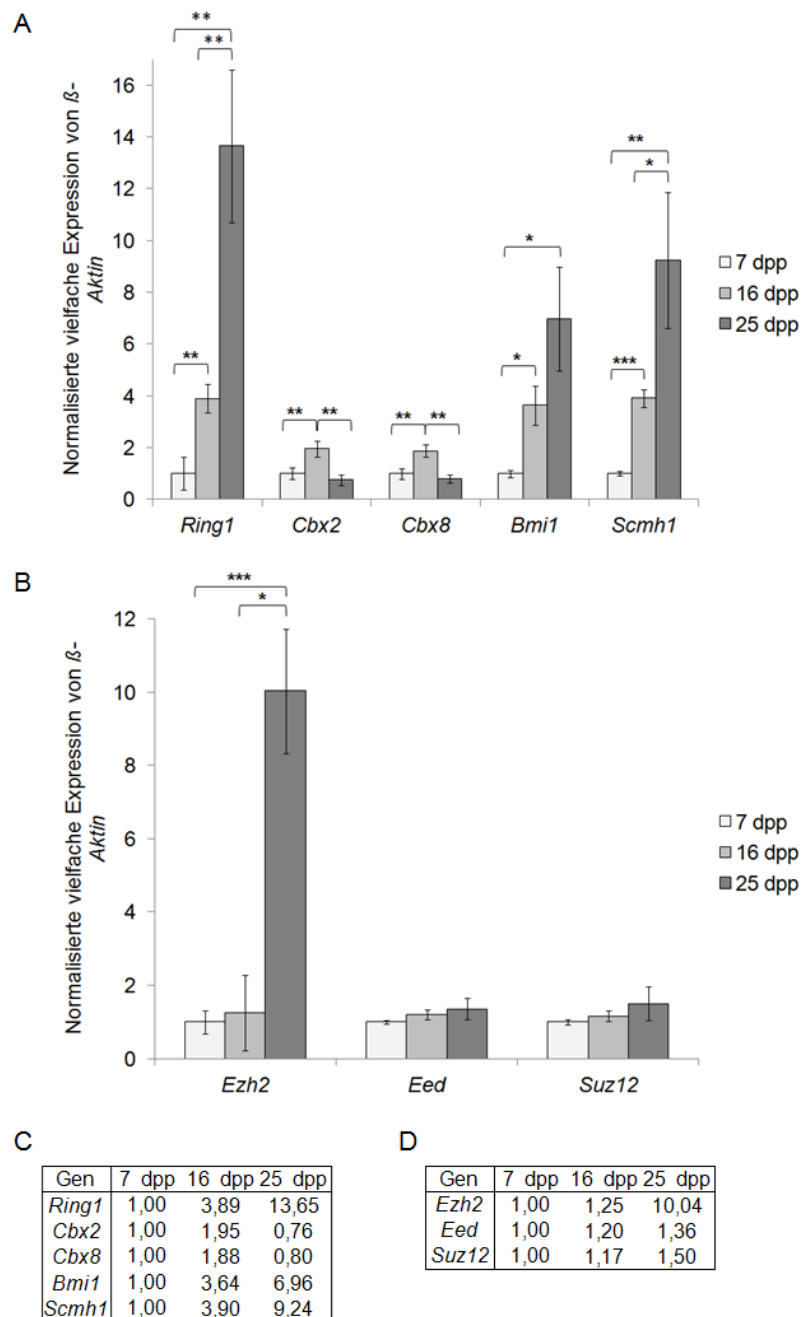


Abbildung 21: Transkriptverteilung klassischer Untereinheiten des PRC1 und PRC2 in murinen Testes mit unterschiedlicher Keimzellenzusammensetzung

Dargestellt sind die Ergebnisse der qPCR ausgewählter Untereinheiten des PRC1 und PRC2 an muriner cDNA aus juvenilen Testes im Alter von 7, 16 und 25 dpp. Normalisiert wurde gegen β -Aktin. Als Referenz wurde die Expression der 7 dpp-Testes auf 1 gesetzt. Die Signifikanz wurde mittels t-Test berechnet, wobei die gängigen Parameter verwendet wurden: * $\leq 0,05$; ** $\leq 0,01$; *** $\leq 0,001$. (A) Von den analysierten PRC1-Untereinheiten sind *Ring1*, *Bmi1* und *Scmh1* in meiotischen (16 dpp) und post-meiotischen (25 dpp) Keimzellen signifikant angereichert. *Cbx2* und *Cbx8* sind nur in meiotischen Keimzellen signifikant angereichert, in post-meiotischen Keimzellen ist eine signifikante Reduktion der Transkripte zu beobachten. (B) *Ezh2* ist als einziges Transkript der getesteten PRC2-Untereinheiten in post-meiotischen Keimzellen signifikant angereichert. *Eed* und *Suz12* zeigen keine signifikanten Unterschiede in ihrer Transkription in den verschiedenen Keimzellen. (C - D) Expressionswerte der Untereinheiten des PRC1 (C) und PRC2 (D), normalisiert gegen β -Aktin. Alle Werte in 16 und 25 dpp Testes über 1 bedeuten einen Anstieg der Expression im Vergleich zu den 7 dpp Testes. Alle Werte in 16 und 25 dpp Testes unter 1 bedeuten einen Abfall der Expression im Vergleich zu den 7 dpp Testes.

Von den analysierten PRC1-Untereinheiten konnte für *Ring1*, *Bmi1* und *Scmh1* eine signifikante Anreicherung der Transkripte in meiotischen (16 dpp) und post-meiotischen (25 dpp) Keimzellen dargestellt werden (siehe Abbildung 21A). Zwei Transkripte, *Cbx2* und *Cbx8*, reicherten sich zunächst in meiotischen (16 dpp) Keimzellen signifikant an, wurden jedoch zeitabhängig in post-meiotischen Keimzellen (25 dpp) signifikant reduziert (siehe Abbildung 21A).

Bezüglich der PRC2-Untereinheiten zeigte nur *Ezh2* eine signifikante Anreicherung in den post-meiotischen (25 dpp) Keimzellen (siehe Abbildung 21B). Für *Suz12* und *Eed* konnten keine signifikanten Transkriptionsunterschiede zwischen den verschiedenen Keimzellen gezeigt werden.

Auch die Transkripte der PRC1-Untereinheiten *Ring1*, *Bmi1* und *Scmh1* sowie der PRC2-Untereinheit *Ezh2* sind wie *Brdt* in meiotischen und post-meiotischen Keimzellen signifikant angereichert.

7 Diskussion

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob neben den bekannten klassischen BRD-Proteinen weitere im Säugertestis exprimiert sind und an welchen Prozessen während der Spermatogenese diese beteiligt sein könnten. Zudem sollte analysiert werden, ob die klassischen Untereinheiten der PRCs in den Keimzellen von *Mammalia* vorhanden sind.

Um die Expression der analysierten BRD-Proteine interpretieren zu können, wird im folgenden Abschnitt die zelluläre Lokalisation der Transkription als auch des Histon-Protamin-Wechsels im Detail erläutert.

7.1 Detaillierte histologische Übersicht über das Auftreten der aRNA-Pol II und H4ac im Vergleich zur Expression von TNP1, PRM1 und PRM2

Die Säugerspermatogenese in der post-meiotischen Phase ist durch distinkte morphologische Veränderungen charakterisiert, die größtenteils auf Proteinen basieren, deren mRNAs translational reprimiert sind. Dadurch, dass die Transkription im Verlauf der Spermatidendifferenzierung zum Erliegen kommt, müssen Spermiogenese-relevante mRNAs bereits in frühen Spermatiden transkribiert und translational reprimiert werden (Kierszenbaum *et al.*, 1975; Steger, 1999). Während der Reorganisation des Chromatins wird dieses geöffnet, ein Prozess der u. a. durch die Hyperacetylierung von H4 vermittelt wird (Grimes Jr *et al.*, 1984; Sonnack *et al.*, 2002). Im Verlauf der Chromatin-Umstrukturierung werden die Histone erst durch Transitionsproteine, danach durch Protamine ersetzt (Steger, 1999). Um diese Ereignisse am Chromatin der Spermatiden zeitlich einzuordnen, wurden detaillierte histologische Analysen durchgeführt (siehe Abbildung 15, 16 und 22). Ziel dieser Analysen war es, die zelluläre Expression dieser Proteine mit der Expression der BRD-Proteine zu vergleichen. Dies sollte erste Indizien liefern, an welchen Prozessen die zu untersuchenden Proteine während der Spermatogenese, der Transkription oder an dem Histon-Protamin-Wechsel, beteiligt sein könnten.

7.1.1 Die aRNA-Pol II ist im Säugerhoden sehr konserviert zwischen Mäusen und Menschen

Als Marker für die Transkription wurden die Präparate gegen aRNA-Pol II gefärbt. Stimmig mit den Daten von Kierszenbaum *et al.*, (1975) und Dottermusch-Heidel *et al.*, (2014b) konnte eine starke Kernfärbung in Mäusen bis zu step 8-Spermatiden (Abbildung 22 und 15, A - C) und im Menschen bis zu step 3-Spermatiden (Abbildung 22 und 16, A - B) nachgewiesen werden. In Mäusen war aRNA-Pol II sogar noch schwach in step 9 - 10-Spermatiden detektierbar (Abbildung 15, D). Das (dezente) Auftreten in einem späten Stadium ist nachvollziehbar. Möglicherweise endete hier die Transkription nicht abrupt, sondern wurde langsam herunter reguliert. Dennoch ist bei dieser Interpretation Vorsicht geboten. In menschlichen Zellen tritt die aRNA-Pol II nach dem runden step 3-Spermatiden-Stadium nicht mehr auf. Es scheint, dass im humanen Testis die Transkription abrupt nach den step 3-Spermatiden beendet wird. Hypothetisch könnte

im humanen Testis in step 4-Spermatiden noch ein geringes Maß an Transkription statt finden, dieses jedoch so gering ist, dass es mit dem verwendeten Antikörper nicht mehr detektiert werden kann. Unabhängig davon konnte die testikuläre Proteinverteilung von aRNA-Pol II in Mäusen und Menschen, wie in Dottermusch-Heidel *et al.*, (2014b) gezeigt, verifiziert werden (siehe Abbildung 22).

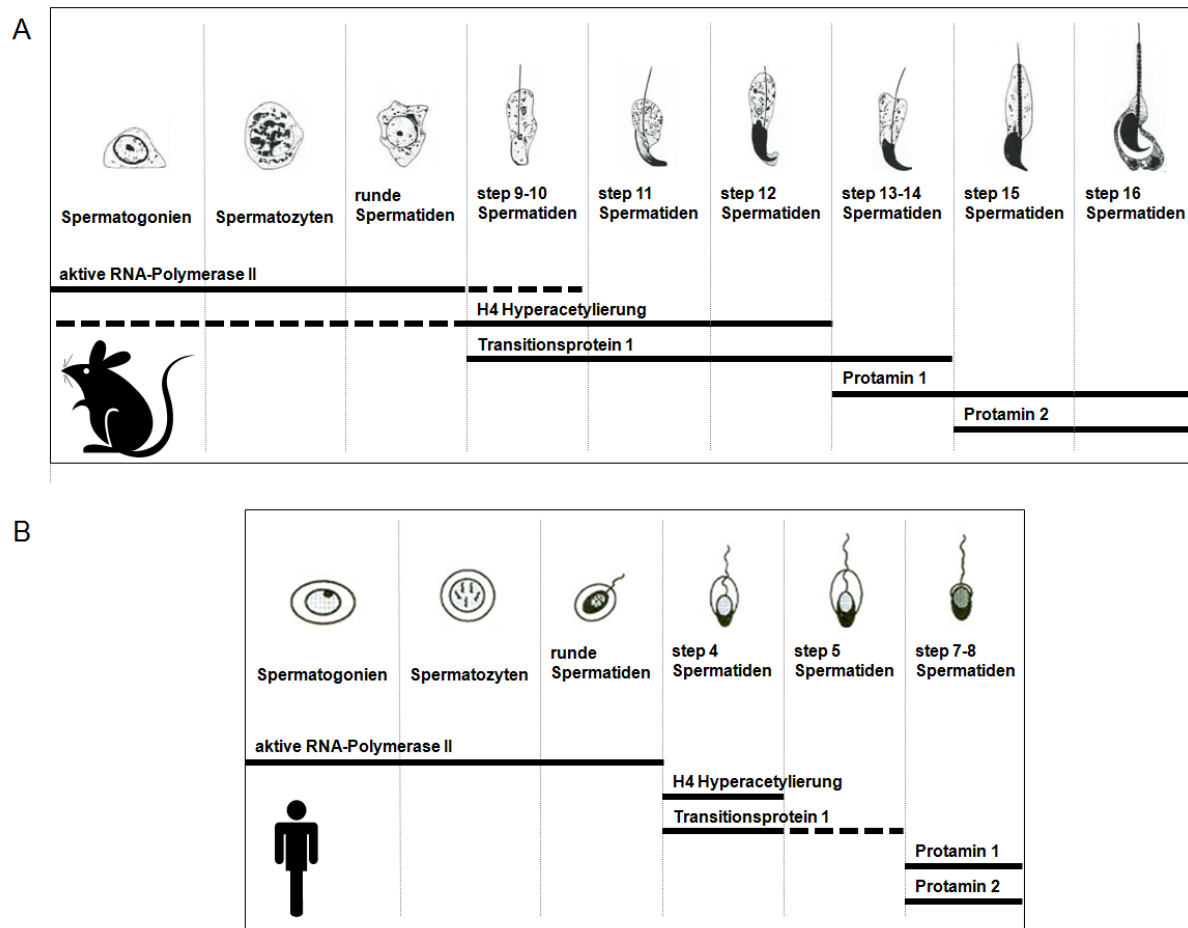


Abbildung 22: Übersicht über die Markierungen mit Markern für die Transkription und den Histon-Protamin-Wechsel in Maus und Mensch

Dargestellt ist eine schematische Übersicht über die Markierungen gegen aktive RNA-Polymerase II als Marker für die Transkription, gegen Histon H4 Hyperacetylierung und Transitionsprotein 1 als Marker für den bevorstehenden Histon-Protamin-Wechsel, gegen Protamin 1 und Protamin 2 als Marker für den vollendeten Histon-Protamin-Wechsel in Mäusen (A) und Menschen (B). Die humanen step 6-Spermatiden sind nicht berücksichtigt worden, da dieses Stadium selten in humanen Testispräparaten vorzufinden ist. Modifiziert nach (Bergmann, 2009; Russell *et al.*, 1990).

7.1.2 H4ac tritt in Mäusen und Menschen in elongierten Spermatiden auf

Charakteristisch für den weiteren Verlauf der Spermiogenese ist die Hyperacetylierung von Histon H4, die mit der Öffnung der Chromatinstruktur z. B. für den Histon-Protamin-Wechsel assoziiert ist (Braun, 2001; Morinière *et al.*, 2009). Dottermusch-Heidel *et al.*, (2014b) beschreiben die H4ac im murinen Testis als Kernmarkierung in step 9 - 10-Spermatiden, wobei die Markierung in step 10-Spermatiden dominant vorliegt. Die Befunde stimmen mit den in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnissen überein, wobei hier die starke Kernfärbung bis hin zu den step 12-Spermatiden anhielt (siehe Abbildung 22 und 15, J - L). Die

längere Detektion der mH4ac könnte damit zusammenhängen, dass in diesem Falle eine 4 % F-PBS statt einer Bouin Fixierung der Präparate verwendet wurde. 4 % F-PBS erlaubt eine intensivere Färbung, verglichen zum Bouin-Protokoll. Der Nachteil dieser Fixierung liegt darin, dass häufig leichte Hintergrundfärbungen im Zytoplasma als auch in den Nuklei aller Keimzellen auftreten. Tatsächlich trat eine leichte Färbung in den Kernen der Spermatogonien, Spermatozyten und runden Spermatiden (siehe Abbildung 15, G - L) nach Inkubation mit dem Anti-H4ac Antikörper auf. Es ist durchaus möglich, dass auch in früheren Keimzellen (Spermatogonien bis runde Spermatiden) eine H4ac auftritt, da in diesen Keimzellen noch Transkription stattfindet und auch hierfür eine offene Chromatinstruktur benötigt wird. Obwohl der gleiche Antikörper gegen H4ac verwendet wurde wie in Dottermusch-Heidel *et al.*, (2014b), wird vermutet, dass es sich hierbei um ein spezifisches Signal der frühen Keimzellen handelt.

Im humanen Testis ist für die H4ac eine starke Färbung im Nukleus der step 4 sowie eine schwache Färbung in step 5-Spermatiden beschrieben worden (Dottermusch-Heidel *et al.*, 2014b). In der vorliegenden Arbeit ist hH4ac nur als starke Kernfärbung in step 4-Spermatiden zu sehen (Abbildung 22 und 16, G). Im Vergleich zu Dottermusch-Heidel *et al.*, (2014b) wurden hier die Testispräparate nach der Antikörpermarkierung mit Hämatoxylin gefärbt. Dies hat den Vorteil, dass alle basophilen Strukturen, zu denen die DNA zählt, blau-violett erscheinen. Allerdings ist nachteilig zu werten, dass diese Färbung schwache Antikörpermarkierungen überdeckt. Die schwache Färbung der hH4ac ist nur dann zu sehen, wenn keine Gegenfärbung der Zellkerne mit Hämatoxylin durchgeführt wird (Dottermusch-Heidel *et al.*, 2014b, ergänzende Materialien). Das in dieser Arbeit vorliegende Expressionsmuster der H4ac stimmt somit mit den Daten der Literatur überein (Dottermusch-Heidel *et al.*, 2014b).

7.1.3 In *Mammalia* ist TNP1 wie H4ac in elongierten Spermatiden exprimiert

Beim Histon-Protamin-Wechsel werden die Histone zuerst von TNP1 und TNP2 ersetzt (Meistrich *et al.*, 2003). In Mäusen liegt TNP1 als Kernfärbung von step 9 - 10 bis hin zu step 13 - 14-Spermatiden vor (siehe Abbildung 22 und 15, P - R, M), wobei das Signal in den späten Spermatiden vom Kern ins Zytoplasma ausstrahlt. Entweder ist die Färbung gegen TNP1 so stark, dass sich das Signal auf das Zytoplasma unspezifisch ausweitet oder das Zytoplasma der step 13 – 14-Spermatiden ist tatsächlich spezifisch gefärbt. Eine Markierung im Zytoplasma dieser Keimzellen könnte darauf hinweisen, dass mTNP1 im Zytoplasma degradiert wird. Bisher wurde mTNP1 an Quetschpräparaten von Mäusen beschrieben, in denen mTNP1 nur im Nukleus der step 10 bis step 13-Spermatiden zu detektieren war (Zhao *et al.*, 2004b). Basierend auf diesen Daten wurde vermutet, dass das in dieser Arbeit beschriebene mTNP1- Signal sich nur auf den Zellkern der step 13 – 14-Spermatiden bezieht. Diese intensive Färbung könnte durch eine zu hohe Antikörperkonzentration oder der Menge an mTNP1 im relativ kleinen Nukleus hervorgerufen worden sein. Die Ergebnisse aus Zhao *et al.*, (2004b) konnten damit in dieser Arbeit reproduziert werden. Die Erkenntnisse, dass mTNP1 wie mH4ac über einen längeren Zeitraum exprimiert wird (step 9 - 12) deuten

darauf hin, dass der Austausch der Histone sukzessiv erfolgt.

TNP1 lag im Menschen im Kern der step 4-Spermatiden sowie zytoplasmatisch in step 5-Spermatiden vor (siehe Abbildung 22 und 16, K - L). Das Färbemuster lässt die Interpretation zu, dass hTNP1 vom Nukleus der step 4-Spermatiden zum Zytoplasma der step 5-Spermatiden transportiert wird, um dort degradiert zu werden. Steger *et al.*, (1999) beschrieb hTNP1 als nukleäres Signal in step 3 - 4-Spermatiden. Sowohl in Steger *et al.*, (1999) als auch in dieser vorliegenden Arbeit wurden die humanen Testispräparate nach den Vorgaben von Clermont (1963) klassifiziert. Somit kann dies als Ursache für das versetzte Expressionsmuster von hTNP1 ausgeschlossen werden. An dieser Stelle sollte erwähnt werden, dass die von Steger *et al.*, (1999) dargestellten Expression von hTNP1, auch eine Färbung der step 5-Spermatiden zeigt. Diese Markierung wird auch in der Bildunterschrift beschrieben, im Text wird jedoch nur die Expression in den step 3 – 4-Spermatiden erörtert. Zudem machen die Autoren Steger *et al.*, (1999) keine Angaben zum verwendeten Antikörper, zu Fixiermethoden oder den verwendeten Testispräparaten, weshalb das versetzte Expressionsmuster vermutlich auf einem der drei genannten Faktoren beruht. Zumindest die Expression in step 4-Spermatiden deckt sich mit den publizierten Daten.

7.1.4 PRM1 und PRM2 sind im Säugertestis in späten Spermatiden exprimiert

Während des Histon-Protamin-Wechsels werden die Transitionsproteine wiederum von PRM1 und PRM2 ausgetauscht (Dadoune, 2003). Die eigenen Resultate verweisen auf mPRM1 als dominantes Signal im Nukleus ab step 13 – 14 und mPRM2 ab step 15-Spermatiden (Abbildung 22 und 15, S - U, b - c). Auffällig war auch hier eine zytoplasmatische Anfärbung. Wie bereits schon für mTNP1 diskutiert (siehe Abschnitt 7.1.3) könnte dies in einer zu hoch verwendeten Antikörperkonzentration begründet sein. Laut den Daten von Zhao *et al.*, (2004b) ist mPRM1 als schwache Kernmarkierung ab step 10-Spermatiden und mPRM2 als leichte Markierung im Nukleus ab step 12-Spermatiden detektierbar, wobei mPRM1 ab step 13 - 14 und mPRM2 ab step 15-Spermatiden am stärksten zum Vorschein kommen. In der vorliegenden Arbeit wurden die gleichen Antikörper gegen PRM1 und PRM2 eingesetzt wie in Zhao *et al.*, (2004b). Im Unterschied zu Zhao *et al.*, (2004b) wurden in der vorliegenden Arbeit die murinen Testes in Bouin fixiert und nicht in CARNOYschem Gemisch. Es liegt nahe, dass die Antikörper nach CARNOYsches Gemisch Fixierung sensitiver an die respektiven Proteine banden, als nach Bouin Fixierung, weshalb Zhao *et al.*, (2004b) zwar quantitativ geringere Mengen an PRM1 und PRM2 detektierten, diese aber spezifischer lokalisieren und zuordnen konnten.

In humanen Testes konnten hPRM1 und hPRM2 in den Nuklei von step 7 - 8-Spermatiden nachgewiesen werden (Abbildung 22 und 16 M, Q). Publiziert sind hPRM1 und hPRM2 als nukleäre Signale von step 4 bis hin zu step 8-Spermatiden (Steger, 1999). Auch hier lässt sich spekulieren, dass Steger *et. al.*, (1999) ein anderes/sensitiveres Fixativ gewählt hat, wodurch geringe Mengen an PRM1/PRM2 spezifisch detektiert werden konnten.

Obwohl in der vorliegenden Arbeit z. T. geringe Unterschiede im Vorkommen bzw. im Expressionsmuster der oben genannten Proteine (aRNA-Pol II, H4ac, TNP1, PRM1, PRM2) auftraten, stimmt die Tendenz dieser Antikörpermarkierungen mit den Daten der Literatur überein. Zudem konnte der zeitliche Ablauf der Transkription bis hin zum Histon-Protamin-Wechsel dargestellt werden. Aufgrund dieser Resultate kann nun die Proteinexpression der analysierten BRD-Proteine und PRC-Untereinheiten mit diesen verglichen werden, um erste Indizien zu erhalten, an welchen Prozessen sie während der Spermatogenese beteiligt sein könnten.

7.2 *Brdt* ist signifikant in Spermatozyten und runden Spermatiden angereichert und in meiotische sowie post-meiotische Funktionen involviert

Für die Analyse der Transkriptverteilung zwischen den verschiedenen Keimzellen wurden unterschiedlich alte juvenile Mäuse gewählt, die gerade die erste Welle der Spermatogenese durchliefen. Die Testes enthielten entsprechend Spermatogonien (7 dpp), Spermatogonien und Spermatozyten (16 dpp) sowie Spermatogonien, Spermatozyten und frühe Spermatiden (25 dpp) (siehe Abbildung 11). Aus den Testes dieser Tiere wurde RNA isoliert, cDNA synthetisiert und anschließend mittels qPCR auf entwicklungsabhängige Transkriptionsunterschiede hin untersucht. Als Kontrollgen diente *Brdt*, da die Transkriptverteilung für diese mRNA bereits publiziert ist (Gaucher *et al.*, 2012). In der vorliegenden Arbeit konnte ein signifikanter Anstieg von *mBrdt* Transkripten in 16 dpp-Testis und 25 dpp-Testis beobachtet werden (siehe Abbildung 12A). Die Autoren Gaucher *et al.*, (2012) zeigten, dass die mRNA von *mBrdt* in meiotischen sowie post-meiotischen Keimzellen angereichert ist.

mBRDT wurde in der vorliegenden Arbeit in Zellkernen der Spermatozyten bis hin zu step 12-Spermatiden in 4 % F-PBS fixierten murinen Präparaten detektiert (siehe Abbildung 23 und 17, G - L). Laut Shang *et al.*, (2007) ist mBRDT in Bouin fixierten Präparaten nur in den Kernen der Spermatozyten und runden Spermatiden lokalisiert. Der hier erbrachte Nachweis einer späten Präsenz in step 12-Spermatiden lässt sich dahingehend begründen, dass eine sensitivere F-PBS-Fixierung gewählt wurde. Diese Fixierung ermöglicht nicht nur die Detektion geringerer Mengen an Protein, sondern auch die Antikörperbindung über einen längeren Zeitraum hinweg, verglichen zur Bouinfixierung. Vermutlich ist dieser Umstand verantwortlich dafür, dass mBRDT in F-PBS fixierten Präparaten länger zu detektieren war. Des Weiteren korrespondiert die Transkriptverteilung von *mBrdt* mit der Proteinexpression von mBRDT.

Die Proteinverteilung von hBRDT im humanen Testis war der Verteilung im murinen Testis sehr ähnlich (siehe Abbildung 23). Die Färbung gegen hBRDT war sehr schwach an der Kernmembran der Spermatozyten ausgeprägt und wurde dominant in den Kernen der step 1 bis step 4-Spermatiden (siehe Abbildung 18, I - L). Im Vergleich dazu konnten Barda *et al.*, (2012) hBRDT immunhistologisch als auch *via* Fluoreszenzfärbung im Nukleus der Spermatozyten bis hin zu Spermatozoa aus Ejakulat nachweisen. Die genannte Arbeitsgruppe verwendete zwar das gleiche Fixativ (Bouin), jedoch einen anderen Antikörper.

Spekulativ lässt sich vermuten, dass dies der Grund für die positive hBRDT-Farbreaktion bis hin zum Spermatozoa-Stadium ist.

Die eigene immunhistochemische Auswertung belegte zudem, dass sich die Expression von BRDT z. T. mit dem Auftreten der aRNA-Pol II sowie H4ac als auch der Expression von TNP1 überlappt (siehe Abbildung 23). Diese Beobachtung stimmt mit den postulierten Funktionen von BRDT überein. BRDT, das in Spermatozyten/runden Spermatiden exprimiert wird, könnte an der Transkriptionsaktivierung meiotischer und post-meiotischer Gene beteiligt sein (Gaucher *et al.*, 2012). In runden/elongierten Spermatiden exprimiertes BRDT bindet hypothetisch an hyperacetyliertes H4 und trägt somit zur Kompaktierung des Chromatins bei (Pivot-Pajot *et al.*, 2003).

7.3 Identifizierung einiger BRD-Proteine, die wie BRDT an der Transkription meiotischer sowie post-meiotischer Gene involviert sein könnten

Um zu analysieren, ob neben den bekannten klassischen BRD-Proteinen weitere BRD-Proteine im Säugertestis exprimiert werden, wurden ausgewählte BRD-Proteine auf ihr Vorkommen in Testes von Mäusen und Menschen auf Transkript- und Proteinebene hin evaluiert. Für die Transkripte der murinen BRD-Proteine *Brd1*, *Brd2*, *Brd7* und *Pcaf* konnte eine analoge Transkriptverteilung wie für *Brdt* beobachtet werden. Dies bedeutet, dass die Transkripte in meiotischen (16 dpp) und post-meiotischen (25 dpp) Keimzellen signifikant angereichert sind. Die murinen Transkripte *Brd3*, *Brd8*, *Tif1a* und *Smarca2* sind demgegenüber nur in runden Spermatiden der 25 dpp-Testis signifikant aufzufinden (siehe Abbildung 12 und 13). Offensichtlich sind somit die Transkripte aller untersuchten BRD-Proteine (*Brd1-9*, *Pcaf*, *Tif1a*, *Smarca2*) im Mäusetestis vorhanden. Die Präsenz der Transkripte *Brd7*, *Brd8*, *Brd9* und *Pcaf* wurde dabei in der vorliegenden Arbeit erstmalig belegt.

7.3.1 *Brd1* ist in meiotischen und post-meiotischen Keimzellen signifikant angereichert

Im Zusammenhang mit der Säugerspermatogenese ist bisher nur von McCullagh *et al.*, (1999) bekannt, dass hBRD1 im Nukleus der Spermatozyten exprimiert wird. In den eigenen Versuchen konnte die Expressionsverteilung von BRD1 nicht ermittelt werden, da der Antikörper weder im murinen noch im humanen Testis ein Farbsignal hervorrief. Dieser Befund mag die (spekulative) Schlussfolgerung erlauben, dass BRD1 nicht im murinen und humanen Testis exprimiert wird. Dennoch erscheint dies nicht logisch. Tatsächlich konnte in der vorliegenden Arbeit das Transkript *mBrd1* im Mäusehoden detektiert werden (siehe Abbildung 12B). Auch ist die Expression von BRD1 in humanen Keimzellen bereits publiziert. Vermutlich ist daher der eingesetzte Antikörper für dieses Gewebe bzw. für diese Art der Anwendung nicht geeignet. Die analoge Transkriptverteilung von *mBrd1* mit *Brdt* könnte darauf hinweisen, dass mBRD1 in die Transkriptionsaktivierung meiotisch als auch post-meiotisch relevanter Gene eingebunden ist. Dieser

Hypothese müsste jedoch weiter nachgegangen werden.

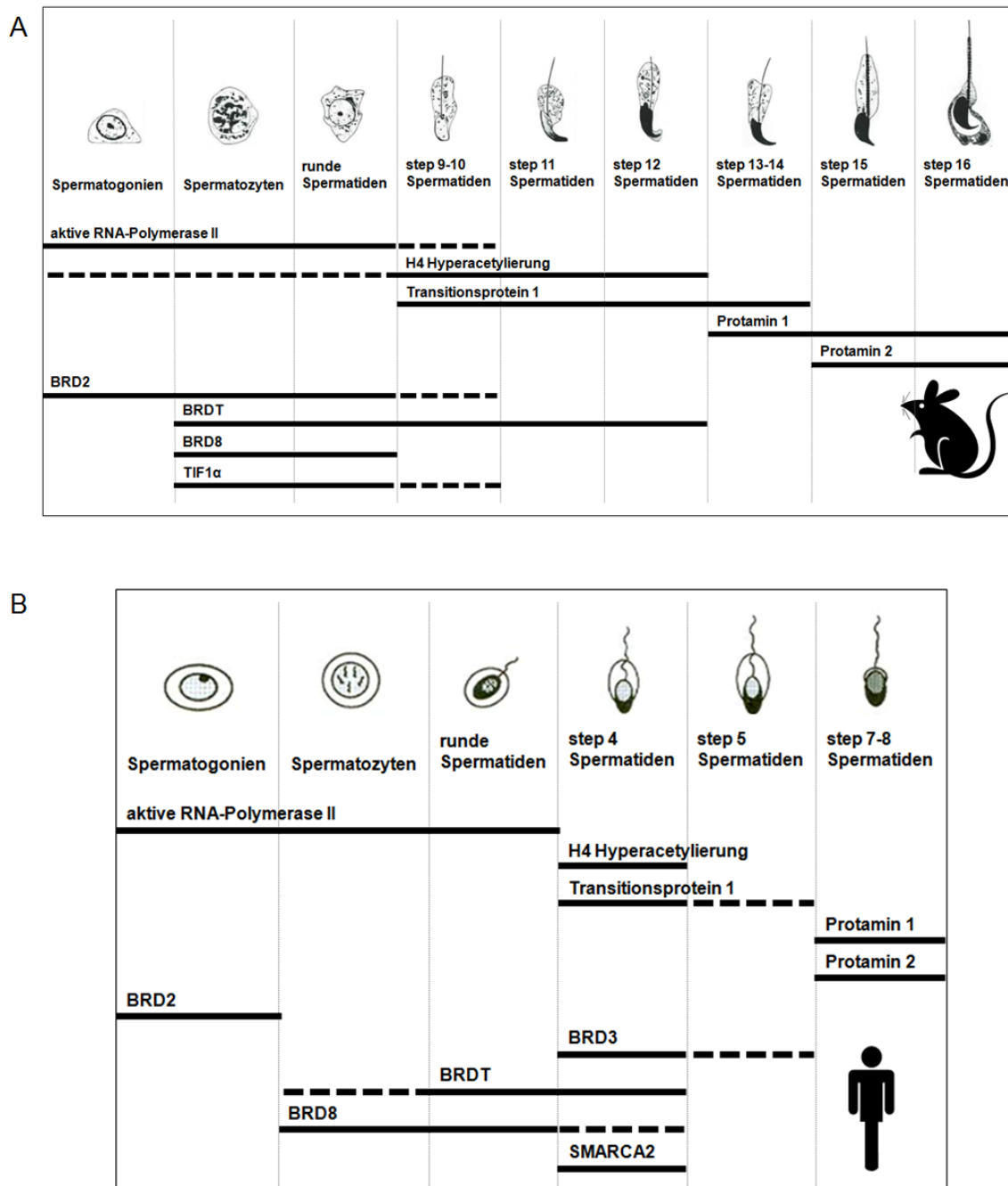


Abbildung 23: Übersicht der immunhistochemischen Markierung der untersuchten BRD-Proteine an murinen und humanen Testes

Dargestellt ist eine schematische Übersicht über die Markierungen gegen BRD2, BRD3, BRD4, BRDT, BRD8, TIF1α und SMARCA2 im direkten Vergleich mit den Markern für die Transkription (αRNA-Pol II) und dem Histon-Protamin-Wechsel (H4ac, TNP1, PRM1, PRM2) in Maus (A) und Mensch (B). Die humanen step 6-Spermatiden sind nicht berücksichtigt worden, da dieses Stadium selten in humanen Testispräparaten vorzufinden ist. Modifiziert nach (Bergmann, 2009; Russell *et al.*, 1990).

Christensen *et al.*, (2012) konnten BRD1 allerdings bereits mit dem Transkriptionsprozess in Verbindung bringen. Demnach ist BRD1 in Säugern an der Transkriptionsregulation des zentralen Nervensystems als auch an der Gehirnentwicklung beteiligt.

Um die Proteinexpression im murinen und humanen Testis zu untersuchen, sollten konsequenterweise die Immunmarkierungen mit anderen Antikörpern gegen BRD1 wiederholt werden. Um die Transkriptverteilung innerhalb der Keimzellen von *mbrd1* zu verifizieren und diese für *hbrd1* zu ermitteln, könnten *in-situ* Hybridisierungen mit spezifischen Sonden gegen *brd1* durchgeführt werden.

7.3.2 mBRD2 könnte wie mBRDT an der Transkription sowie am Histon-Protamin-Wechsel beteiligt sein

In der vorliegenden Arbeit konnte mBRD2 im Nukleus der Spermatogonien als auch im Nukleus der step 9 - 10-Spermatiden angefärbt werden (Abbildung 23 und 17, A - F), in Übereinstimmung mit der von Shang *et al.*, (2004) beobachteten mBRD2-Lokalisation. Somit scheint mBRD2 größtenteils in den gleichen Keimzellen wie auch aRNA-Pol II, mTNP1, mH4ac und mBRDT vorzuliegen. Zusätzlich zur Proteinexpression stimmt auch die Transkriptverteilung von *mBrd2* mit *mBrdt* überein. Dieser Befund lässt sich dahin gehend interpretieren, dass mBRD2 wie auch mBRDT an der Transkriptionsaktivierung meiotisch sowie post-meiotisch relevanter Gene und an der Reorganisation des Chromatins beteiligt ist. Unterstützung erfährt diese Vermutung durch Aussagen von LeRoy *et al.*, (2008), nach denen BRD2 eine intrinsische Histon Chaperon Aktivität zugesprochen wird, die für die Transkription des Cyclin D1 Gens essentiell ist. Außerdem ist belegt, dass BRD2 zumindest *in vitro* mit acetyliertem Histon H4K5 und H4K12 interagiert und diese Interaktion während der Meiose bestehen bleibt. Die Autoren vermuteten daher eine Beteiligung von BRD2 an der Transkription (Kanno *et al.*, 2004). Im Kontrast zum Mäusehoden liegt hBRD2 im humanen Testis nur nukleär in den Spermatogonien vor (Abbildung 23 und 18, A - D). Beschrieben wurde bisher, dass das Transkript *hBrd2* im Testis von Patienten mit normaler Spermatogenese und „Sertoli-Zellen Only-Syndrom“ vorzufinden ist (Barda *et al.*, 2012). Über die Proteinexpression von BRD2 im humanen Testis ist bislang nichts bekannt. Die unterschiedliche Expression von BRD2 zwischen Maus und Mensch mag darauf hinweisen, dass BRD2 in beiden Spezies verschiedene Funktionen ausübt bzw. an verschiedenen Prozessen beteiligt ist. In humanen Testes könnte BRD2 beispielsweise in die Transkription Spermatogonien-relevanter Gene eingebunden sein. Nicht auszuschließen sind aber auch andere Steuerfunktionen z. B. bei der Erhaltung der Stamm-Spermatogonien oder in der Regulation der Differenzierung und/oder Mitose. Zur genaueren Aufklärung der Mechanismen wäre es sinnvoll, die BRD2-Expression vor allem im humanen Testis durch *in-situ* Hybridisierungen oder Westerblot-Analysen an isolierten aufgereinigten Keimzellen darzustellen.

7.3.3 mBrd4 ist nicht signifikant in Spermatozyten und runden Spermatiden angereichert

Für das Transkript *mBrd4* konnte in meiotischen (16 dpp) und post-meiotischen (25 dpp) Keimzellen nur geringe Transkriptionsunterschiede festgestellt werden (siehe Abbildung 12B). Die Ableitung, dass BRD4 konstant während der Spermatogenese benötigt wird und sich deshalb das Transkriptionsniveau kaum

ändert, ist spekulativ. Im murinen Testis wird die Expression von mBRD4 im Nukleus von Sertoli-Zellen und Spermatogonien sowie (moderat) in präleptotänen Spermatozyten beschrieben (Shang *et al.*, 2004). Es stellt sich die Frage, warum in post-meiotischen Keimzellen Transkripte von *Brd4* vorhanden sind, obwohl das Protein in diesen Keimzellen nicht mehr zu detektieren ist. Da BRD4 auch im Zellkern der Sertoli-Zell vorliegt, liegt die Vermutung nahe, dass die resultierende Transkriptverteilung von *Brd4* in post-meiotischen Keimzellen alleine auf der Präsenz von Sertoli-Zellen beruht. Analog zu hBRD2 könnte mBRD4 eine keimzellenspezifische Rolle innehaben, z. B. bei der Transkription, Mitose oder Differenzierung von Spermatogonien. In Sertoli-Zellen mag BRD4 an der Synthese oder Sekretion diverser Faktoren wie Proteinen, Steroide und/oder Wachstumsfaktoren beteiligt sein (Weinbauer *et al.*, 2010). Im Kontext der Transkription wird berichtet, dass BRD4 als Bindungsfaktor für Chromatin dient, und zwar durch eine spezifische Bindung an H3K9ac, H3K14ac, H4K5ac2 und H4K12ac2 (Dey *et al.*, 2003; Dey *et al.*, 2000; Dey *et al.*, 2009). Des Weiteren wird BRD4 wie alle BET-Proteine während der Mitose zur transkriptionalen Startseite rekrutiert (Dey *et al.*, 2003; Dey *et al.*, 2000; Kanno *et al.*, 2004) wobei BRD4 den Transkriptionselongationsfaktor P-TEFb an diese Seite bindet (Filippakopoulos *et al.*, 2012). Eine prinzipielle Rolle für BRD4 während der Transkription ist damit belegt.

Aus den vorliegenden Resultaten der Transkript- sowie der Proteinverteilung geht allerdings hervor, dass mBRD4 vermutlich nicht an der meiotischen und post-meiotischen Transkription beteiligt ist.

7.3.4 *mBrd7* zeigt die gleiche Transkriptverteilung wie *mBrdt*

Für BRD7 und BRD8 waren bisher keine Daten zur Transkript- oder Proteinverteilung im murinen und humanen Testis erarbeitet worden. Somit wurde aktuell das erste Mal dargelegt, dass *mBrd7* und *mBrd8* in runden Spermatiden (25 dpp) und *Brd7* zusätzlich in Spermatozyten (16 dpp-Testis) signifikant angereichert sind (siehe Abbildung 12B). Allerdings konnte mit dem gegen BRD7 gerichteten Antikörper weder am murinen noch am humanen Testispräparat eine Anfärbung evoziert werden. Aufgrund der analogen Transkriptdaten zwischen *mBrd7* und *mBrdt* könnte mBRD7 eine Funktion an der meiotischen sowie post-meiotischen Transkription innehaben. Auch hier müsste diese Hypothese jedoch durch weitere Experimente verifiziert werden. Bisher konnte BRD7 als Untereinheit des Chromatin-Remodulierungs-Komplexes SWI/SNF-Komplex identifiziert werden (Harte *et al.*, 2010; Kaeser *et al.*, 2008). Kaeser *et al.*, (2008) gehen davon aus, dass BRD7 nicht nur für die Transkriptionsaktivierung, sondern auch für die Reprimierung in embryonalen Stammzellen von Bedeutung ist. Vertiefend wäre die Analyse weiterer Komponenten des SWI/SNF-Komplexes im Testis von *Mammalia* anzustreben, insbesondere im Hinblick auf die Frage, ob der SWI/SNF-Komplex für die Transkription selektiver Gene, z. B. für Spermiogenese-relevante Gene verantwortlich ist. Weiterführende Studien sollten auch die BRD7-Protein- und *Brd7*-Genexpression berücksichtigen, dies unter Einbindung muriner als auch menschlicher Gewebs- bzw. Zellpräparate.

7.3.5 BRD8 könnte aufgrund seiner Transkript- und Proteinexpression an der Transkription während der Spermatogenese involviert sein

Die Proteinverteilung von BRD8 weist nur geringe Unterschiede zwischen Mäusen und Menschen auf (siehe Abbildung 23). In Mäusen ist mBRD8 im Kern pachytäner Spermatozyten bis zu step 8-Spermatiden (Abbildung 17, M - R) zu sehen. Zusätzlich erkennt man in step 1 - 3-Spermatiden ein Farbsignal in den Akrosomvesikeln. Ob es sich dabei um eine spezifische Färbung handelt, ist schwer zu beantworten, da das Akrosom sehr anfällig für Hintergrundfärbungen ist. Unabhängig davon deckt sich die Färbung von mBRD8 mit dem Auftreten der aRNA-Pol II in Mäusen (siehe Abbildung 23). Eine positive Anfärbung des menschlichen hBRD8-Proteins lässt sich, wie in der murinen Testreihe, bereits im Nukleus pachytäner Spermatozyten aufzeigen, ist jedoch auch noch in den Kernen der step 4-Spermatiden zu visualisieren (Abbildung 18, M - P). Im Kontrast zu Mäusen ist hBRD8 in humanen Testes in den gleichen Keimzellen vorhanden wie die aRNA-Pol II, TNP1 und H4ac (siehe Abbildung 23). Die Autoren Poirier *et al.*, (2008) schreiben BRD8 eine Beteiligung an der Regulation der PPARgamma Zielgene während der Adipogenese zu. Auch in Mäusen und Menschen könnte BRD8 wie BRDT an der Transkription meiotischer sowie post-meiotischer Gene beteiligt sein, und im humanen Testis zusätzlich eine post-meiotische Funktion ausüben. Zu nennen ist diesbezüglich die Kompaktierung und/oder Remodulierung des Chromatins.

7.3.6 Das Transkript *mBrd9* ist wie *mBrd4* nicht signifikant in meiotischen und post-meiotischen Keimzellen angereichert

Von BRD9 sind bisher weder Daten über die Transkript- noch über die Proteinverteilung im Testis von *Mammalia* bekannt. Die Transkriptverteilung von *mBrd9* ist analog zu der Transkriptverteilung von *mBrd4*, d. h. *Brd9* ist relativ konstant in den Keimzellen der Spermatozyten (16 dpp) und runden Spermatiden (25 dpp) exprimiert (siehe Abbildung 12B). Vermutlich wird BRD9 konstant während der Spermatogenese benötigt. Aufgrund der ähnlichen Transkriptverteilung von *Brd9* und *Brd4* könnte auf eine BRD9-Proteinexpression geschlossen werden, die derjenigen der BRD4 ähnelt. Dies ist spekulativ, ein von BRD4 differierendes Expressionsmuster ist nicht auszuschließen. Beschrieben wird BRD9 als Untereinheit des endogenen SWI/SNF-Komplexes von *Mammalia*, welches an der Transkription und der Reparatur von DNA beteiligt ist (Kadoch *et al.*, 2013). BRD9 vermag somit auch im Säugertestis über den SWI/SNF-Komplex eine Rolle während der Transkription zu spielen. Aufgrund der Tatsache, dass *Brd9* nicht signifikant in post-meiotischen Keimzellen angereichert ist, wird abgeleitet, dass BRD9 nicht an der Transkription meiotischer als auch postmeiotisch relevanter mRNAs beteiligt ist.

7.3.7 mPcaf ist wie mBrdt in 16 und 25 dpp-Testis signifikant angereichert

Die Transkriptverteilung von mPcaf zeigt die gleiche Tendenz wie die Transkriptverteilung von mBrdt. Weshalb nur auf Grundlage der analogen Transkriptverteilung die Möglichkeit besteht, dass auch für PCAF eine Funktion in der Transkriptionsinitiation während der Spermatogenese angenommen werden kann. Zudem ist PCAF als Untereinheit der SAGA- und ATAC-Komplexe bekannt, welche u. a. die Transkription von abundanten sowie von gewebespezifisch transkribierten Genen steuern und als Teil des RNA-Polymerase II Holoenzym an der Transkriptionselongation beteiligt sind (Krebs *et al.*, 2011). Da diese Komplexe bereits mit gewebespezifischer Transkription in Verbindung gebracht wurden, könnte PCAF an der Transkriptionsaktivierung z. B. post-meiotisch relevanter Gene, *via* der SAGA- und ATAC-Komplexe beteiligt sein. Um diese Hypothese weiter zu überprüfen, müssten weitere Untereinheiten der SAGA- und ATAC-Komplexe im Testis analysiert werden. Auch hier steht die Analyse der Proteinexpression im Säugertestis noch aus. Zudem könnte die Transkriptverteilung in Mäusen durch *in-situ* Hybridisierungen verifiziert und im menschlichen Testis analysiert werden.

7.3.8 mTIF1α könnte wie mBRDT an der Transkription und Reorganisation des Chromatins involviert sein

Auch für *Tif1α* konnte eine signifikante Anreicherung des Transkripts in den post-meiotischen Keimzellen ermittelt werden, auch wenn das Transkriptniveau in Spermatozyten (16 dpp) zunächst leicht reduziert vorlag und erst im Anschluss signifikant anstieg (25 dpp) (siehe Abbildung 13). In Betracht zu ziehen ist daher, dass in Spermatozyten weniger TIF1α benötigt wird, als in Spermatogonien und Spermatiden. In murinen Testes ist mTIF1α wie mBRDT ab dem Nukleus pachytäner Spermatozyten bis zu den Kernen in step 9 - 10-Spermatiden zu lokalisieren (siehe Abbildung 23 und 17, S - X). Auch diese Expressionsverteilung stimmt mit den Daten der Transkriptverteilung überein. Überraschenderweise konnte in humanen Testes mit dem gleichen Antikörper kein Signal hervorgerufen werden. Vergleichende Studien anderer Arbeitsgruppen demonstrieren, dass das Transkript *mTif1α* im Mäuse-Testis stark angereichert ist und sich das Protein im Zellkern der Spermatogonien bis hin zu elongierten Spermatiden nachweisen lässt (Niederreither *et al.*, 1999). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stehen im Einklang mit den Daten der Literatur. Ob TIF1α auch im humanen Testis exprimiert wird, bleibt vorerst ungeklärt. Da sich das Expressionsmuster von TIF1α mit dem Auftreten der aRNA-Pol II, H4ac und TNP1 zumindest teilweise überlappt, kann davon ausgegangen werden, dass mTIF1α möglicherweise an der Transkription meiotischer und post-meiotischer Gene sowie an der post-meiotischen Restrukturierung des Chromatins beteiligt ist.

Da die Expression von mBRD2, BRD8 und mTIF1α größtenteils mit dem Auftreten der RNA-Pol II und der BRDT-Expression übereinstimmen wird vermutet, dass diese Proteine u. a. an der Transkription meiotischer und post-meiotischer Gene beteiligt sein könnten sowie es für BRDT belegt ist (Gaucher *et al.*, 2012). mBRD2

und mTIF1 α könnten zusätzlich, wie BRDT an der post-meiotischen Remodulierung des Chromatins beteiligt sein, da mBRD2 sowie mTIF1 α auch in post-meiotischen Keimzellen exprimiert werden.

7.4 hBRD3 und hSMARCA2 könnten an der Reorganisation des Chromatins während des Histon-Protamin-Wechsels beteiligt sein

Mit Hilfe der qPCR konnte belegt werden, dass die murinen Transkripte von *Brd3* und *Smarca2* in runden Spermatiden (25 dpp) signifikant angereichert sind (siehe Abbildung 12B, 13). Das Expressionsmuster von BRD3 und SMARCA2 im murinen Testis konnte nicht ermittelt werden, da in Mäusen mit diesen Antikörpern kein Signal zu detektieren war.

In Bezug auf m*Brd3* liegen Berichte vor, nach denen das Gen schwach in späten Spermatozyten, dominant in runden Spermatiden und wieder schwach in frühen elongierten Spermatiden transkribiert wird (Shang *et al.*, 2004). In der vorliegenden Arbeit konnte m*Brd3* in Spermatogonien bis hin zu runden Spermatiden detektiert werden. Aufgrund der Tatsache, dass die qPCR-Methode in der Detektion von Transkripten sensitiver ist im Vergleich zur *in-situ* Hybridisierung, ist es nicht verwunderlich, dass m*Brd3* zusätzlich im Spermatogonien- und Spermatozyten-Stadium detektiert werden konnte. Beim Menschen wurde BRD3 als starkes Signal im Zellkern der step 4-Spermatiden und schwach im Zytoplasma pachytäner Spermatozyten nachgewiesen (Abbildung 23 und 18, E - H). Dieses Zeitmuster deckt sich mit den H4ac und TNP1 Daten, d. h. hBRD3 könnte an der Reorganisation des Chromatins beteiligt sein (siehe Abbildung 23). Dieser Annahme müsste jedoch weiter nachgegangen werden.

Beschrieben wurde die Expression von mSMARCA2 im Nukleus der Spermatozyten und runden Spermatiden (Wang *et al.*, 2012). Somit passt das publizierte Expressionsmuster von mSMARCA2 mit der in der vorliegenden Arbeit ermittelten Transkriptverteilung überein. Unter Berücksichtigung der Transkriptverteilung von m*Brd3* und m*Smarca2* sowie der respektiven Resultate zur SMARCA2- und BRDT-Proteinexpression ist zu vermuten, dass auch diese Proteine an der Transkriptionsinitiation im murinen Testis beteiligt sind.

hSMARCA2 ist wie hBRD3 im Nukleus der step 4-Spermatiden (Abbildung 23 und 18, S) vorhanden. Dies ist erstaunlich, zeigt doch hSMARCA2 ein komplett anderes Expressionsmuster, verglichen zur Verteilung in Mäusezellen. Wie hBRD3 deckt sich die Proteinverteilung von hSMARCA2 mit dem Auftreten von H4ac und TNP1, ein Einfluss von hSMARCA2 auf die Reorganisation des Chromatins im Verlauf des Histon-Protamin-Wechsels erscheint naheliegend. In gutem Einklang steht die Annahme von Chi (2004) die von einer Beteiligung des SMARCA2-Proteins an diversen Prozessen innerhalb der gewebespezifischen Genregulation ausgeht.

Im murinen Testis steht die Untersuchung zur Expression von BRD3 noch aus. In welchem Rahmen dieses Protein in welche Abläufe eingebunden ist, kann daher noch nicht beantwortet werden.

7.5 Die Expression der Untereinheiten der klassischen BRD-Proteine sowie des PRC1/2 sind mittels Westerblot-Analyse nicht eindeutig identifizierbar

Nachdem die Transkriptverteilung der einzelnen BRD- und PRC-Untereinheiten innerhalb der verschiedenen Keimzellen analysiert wurden, sollten Daten zur Proteinexpression erhoben werden. Dazu wurden Westernblot-Analysen an Gesamtproteinextrakt aus 7, 16, 25 dpp und adulten Testes von Mäusen mit spezifischen Antikörpern durchgeführt. Der Fokus wurde auf die BRD-Proteine gelegt, deren Transkripte wie BRDT in Spermatozyten und runden Spermatiden signifikant angereichert waren (BRD1, BRD2, BRD3, BRD7 und BRD8). Für die PRC1-Untereinheiten wurde stellvertretend die Kernuntereinheiten RING1 und EZH2 für PRC2 in die Untersuchungen einbezogen.

In Pilotstudien wurden die Antikörper gegen die oben genannten Proteine an adultem murinen Testis-Gesamtproteinextrakt eingesetzt, um die Eignung der Antikörper auszutesten (siehe Abbildung 14). Dies beinhaltete auch den Vergleich der Epitopsequenz mit der Sequenz der Proteine, zum einem, um die Bindungsspezifität zu überprüfen, zum anderen, um festzustellen welche der vorhergesagten Isoformen von dem jeweiligen Antikörper detektiert wird. Aus Abbildung 14 lässt sich entnehmen, dass bis auf BRD7 die jeweilige Bandenhöhe nicht mit der zu erwartenden Höhe übereinstimmte. Zum Teil wurde nur ein starkes Signal (BRD1, BRD2, BRDT, RING1), zum Teil wurden mehrere Signale unterschiedlicher Intensität (BRD3, BRD8, SMARCA2, EZH2) je Antikörper sichtbar. Ein bekanntes Phänomen in der Proteinbiochemie ist in der Tat, dass Proteine im Westernblot als höhere Signale detektierbar sind als ihre vorhergesagten Isoformen. Dieses Phänomen lässt sich vor allem dadurch erklären, dass Proteine im Organismus meist posttranskriptional durch Methylierung, Acetylierung etc. modifiziert werden und somit eine größere Proteinmasse besitzen. Sind die detektierten Signale hingegen kleiner als erwartet, könnten die Proteine durch z. B. Proteolyse, Abspaltungen oder durch Faltungsisoformen in verkürzter Form im Proteinextrakt vorliegen. Als weitere Erklärung für ein Signal in unerwarteter Größe bleibt anzufügen, dass in dem analysierten Gewebe eine gewebespezifische Isoform existiert, die bisher noch nicht identifiziert bzw. annotiert wurde. Unabhängig davon müssen bei der Interpretation der Daten unspezifische Signale berücksichtigt werden.

Da fast alle Signale nicht den vorhergesagten Isoformen entsprachen, liegt es nahe, dass im murinen Testis, gewebespezifische Isoformen der jeweiligen Proteine existieren. Die Spezifität der Antikörper könnte dennoch in weiterführenden Untersuchungen mittels Peptid-Blockade evaluiert werden.

Um zu belegen, dass es sich bei den detektierten Banden tatsächlich um das entsprechende Protein handelt, wären Westernblot-Analysen an testikulärem Proteinextrakt aus „null-Mutanten“ für die einzelnen Proteine am geeignetsten. Dies war jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich. Somit bleibt letztendlich unklar, ob die aufgezeichneten Proteinbanden spezifischer Natur sind oder nicht. Dennoch waren die detektierbaren Signale für die verwendeten Antikörper stets reproduzierbar an adultem testikulärem Gesamtproteinextrakt. Bei den Westernblot-Analysen von murinem Proteinextrakt verschiedener Alter, trat das Problem auf, dass

mit jedem Versuch eine abweichende Signalverteilung auftrat die sich nicht reproduzieren ließ (siehe Abschnitt 6.5). Trotz der Verwendung von frischem Proteinextrakt und neuer Antikörperaliquots waren die Ergebnisse nicht reproduzierbar. Durch die Coomassie-Färbung der SDS-Gele nach dem Blotten konnte nachgewiesen werden, dass die Proteinverteilung sehr stark zwischen den Versuchen variierte, obwohl stets die gleichen Mengen an Proteinextrakt eingesetzt wurden (siehe Anhang D). Möglicherweise verlief das Blotting nicht optimal und/oder war mit Fehlern behaftet, die die Variationen in der BRDT-Proteinexpression bedingten. Um eine zuverlässige Aussage über die tatsächliche Proteinverteilung auf der Membran treffen zu können, würde sich eine vor dem Blotten durchgeführte Ponceau-Färbung als Mittel der Wahl anbieten. Nicht auszuschließen ist, dass die verwendeten Antikörper für diesen Versuchsaufbau nicht geeignet sind. Als Indiz hierfür ist zu werten, dass laut Gaucher *et al.* (2012) BRDT erst ab 12 dpp im murinen Testis exprimiert und detektierbar ist. In der vorliegenden Arbeit war dies bereits ab 7 dpp der Fall und steht damit im Gegensatz zu Gaucher.

Die beschriebenen Probleme waren ausschlaggebend dafür, dass die Westernblot-Analysen der BRD-Proteine als auch der PRC-Untereinheiten in der vorliegenden Arbeit nicht weiter durchgeführt wurden.

7.6 EZH2 und RING1 sind in murinem und humanem Testes exprimiert

Ein weiterer experimenteller Schwerpunkt wurde auf den potentiellen Nachweis der klassischen Untereinheiten des PRC1 und PRC2 im Testis von *Mammalia* gelegt. Zu diesem Zweck wurden RT-PCRs an adulter muriner RNA mit spezifischen Primern für die jeweiligen Untereinheiten durchgeführt (siehe Abschnitt 6.1). Tatsächlich fanden sich alle untersuchten PRC1- (*Ring1*, *Bmi1*, *Scmh1*, *Cbx2*, *Cbx8*) und PRC2-Transkripte (*Ezh2*, *Eed*, *Suz12*) im Mäusetestis wieder. Nachdem die ausgewählten PRC1 und PRC2-Transkripte im Mäusehoden belegt worden waren, wurden im Weiteren die korrespondierenden Proteine untersucht (siehe Abbildung 19 und 20).

7.6.1 hRING1 könnte an der Kompaktierung des Chromatins im Verlauf des Histon-Protamin-Wechsels beteiligt sein

Überraschend sind die Ergebnisse zu RING1, da sich dessen Expression sehr zwischen Mäusen und Menschen unterschied (siehe Abbildung 24). Im murinen Testis war mRING1 nur als dezentes zytoplasmatisches Signal in Spermatozyten bis zu step 11-Spermatiden zu detektieren (Abbildung 19, A - F). Eine spezifische Färbung vorausgesetzt, wäre RING1 nicht im Zellkern lokalisiert. In diesem Falle übte RING1 im Testis von Mäusen keine Gen-reprimierende Funktion aus und wäre entsprechend auch nicht dem PRC1 zuzuordnen. Dieses Szenario erscheint wenig wahrscheinlich. Vielmehr ist ein falsch-positives Signal als Ursache in Betracht zu ziehen. Zur Aufklärung wäre die Verwendung anderer anti-RING1-Antikörper anzustreben. Des Weiteren wäre es erforderlich die Expression der möglichen anderen PRC1-Untereinheiten im murinem Testis zu evaluieren. Aufgrund der resultierenden Expression von mRING1 ist es

nicht möglich eine Aussage über PRC1 im Mäusehoden zu treffen. Somit kann auch kein Rückschluss gezogen werden ob das postulierte Model von Chen *et al.*, (2005) indem die Autoren postulieren, dass PRC1 nur die Spermiogenese-relevanten Gene reprimiere, auf murine Testes übertragbar wäre.

Im humanen Testis lag RING1 als nukleäres Signal in step 4-Spermatiden sowie akrosomal in step 1 - 3 und step 7 - 8-Spermatiden vor (Abbildung 20, A – D). Die Expression von hRING1 war analog zu dem Auftreten von H4ac und TNP1, was für eine Beteiligung von RING1 an der Reorganisation bzw. Kompaktierung des Chromatins während des Histon-Protamin-Wechsels spricht. Cao *et al.*, (2002) und Francis *et al.*, (2004) berichten übereinstimmend, dass RING1 als Untereinheit des PRC1 die Monoubiquitylierung des Histons H2A (H2AK119Ub1) vermittelt und PRC1 an der Kompaktierung des Chromatins und somit an der Reprimierung dieser Gene beteiligt ist. Somit korreliert die Expression von hRING1 mit der beschriebenen Funktion von RING1 als Untereinheit des PRC1. Es wäre interessant zu ermitteln, ob auch die anderen möglichen PRC1-Untereinheiten (z. B. BMI1, SCMH1) in humanen Testes nur in step 4-Spermatiden vorkommen. Auf Grund der in dieser Arbeit vorliegenden Expression von hRING1, scheint das postulierte Model von Chen *et al.*, (2005) nicht im humanen Testes vorzukommen. Wäre dies der Fall, würde man die PRC1-Untereinheiten in den Kernen der Spermatogonien bis hin zu Spermatozyten bzw. frühe Spermatiden erwarten.

7.6.2 hEZH2 könnte wie mEZH2 an der Umstrukturierung des Chromatins beteiligt sein

In der Maus war mEZH2 nur in Kernen runder Spermatiden zu beobachten (Abbildung 19, G - L). Laut Lambrot *et al.*, (2012) ist mEZH2 nur in der akrosomalen Region der runden Spermatiden angereichert und kolokalisiert dort mit der testisspezifischen H1-Histonvariante H1T2, weshalb die Autoren eine Beteiligung von mEZH2 an der Umstrukturierung des Chromatins im Verlauf der Spermiogenese postulieren. Auch konnte eine Interaktion zwischen mEZH2 und H1T2 belegt werden, die im Einklang mit dem Postulat steht (Lambrot *et al.*, 2012). Obwohl in Lambrot *et al.*, (2012) und in der vorliegenden Arbeit der gleiche Antikörper zur Detektion von mEZH2 verwendet wurde, ergaben sich unterschiedliche Expressionsmuster. Über die Ursache der divergierenden Expression lässt sich nur mutmaßen. Unterschiedliche Antikörperchargen könnten eine unterschiedliche Signaldetektion zur Folge haben. Offen bleibt, ob auch die anderen potentiellen PRC2-Untereinheiten im Mäusehoden nur in runden Spermatiden exprimiert werden. Da dies für mEZH2 gezeigt wurde, liegt es zumindest nahe, dass auch PRC2 nur in runden Spermatiden exprimiert wird.

Humanes EZH2 war vom Spermatozyten- bis zum step 4-Spermatiden-Stadium im Kern visualisierbar und damit deckungsgleich mit aRNA-Pol II, H4ac und TNP1 (Abbildung 24 und 20, E - H). Der Nachweis im späteren Entwicklungsstadium könnte ein Indiz dafür sein, dass hEZH2 wie möglicherweise auch mEZH2 an der Umstrukturierung des Chromatins im Verlauf der Spermiogenese beteiligt ist (Lambrot *et al.*, 2012).

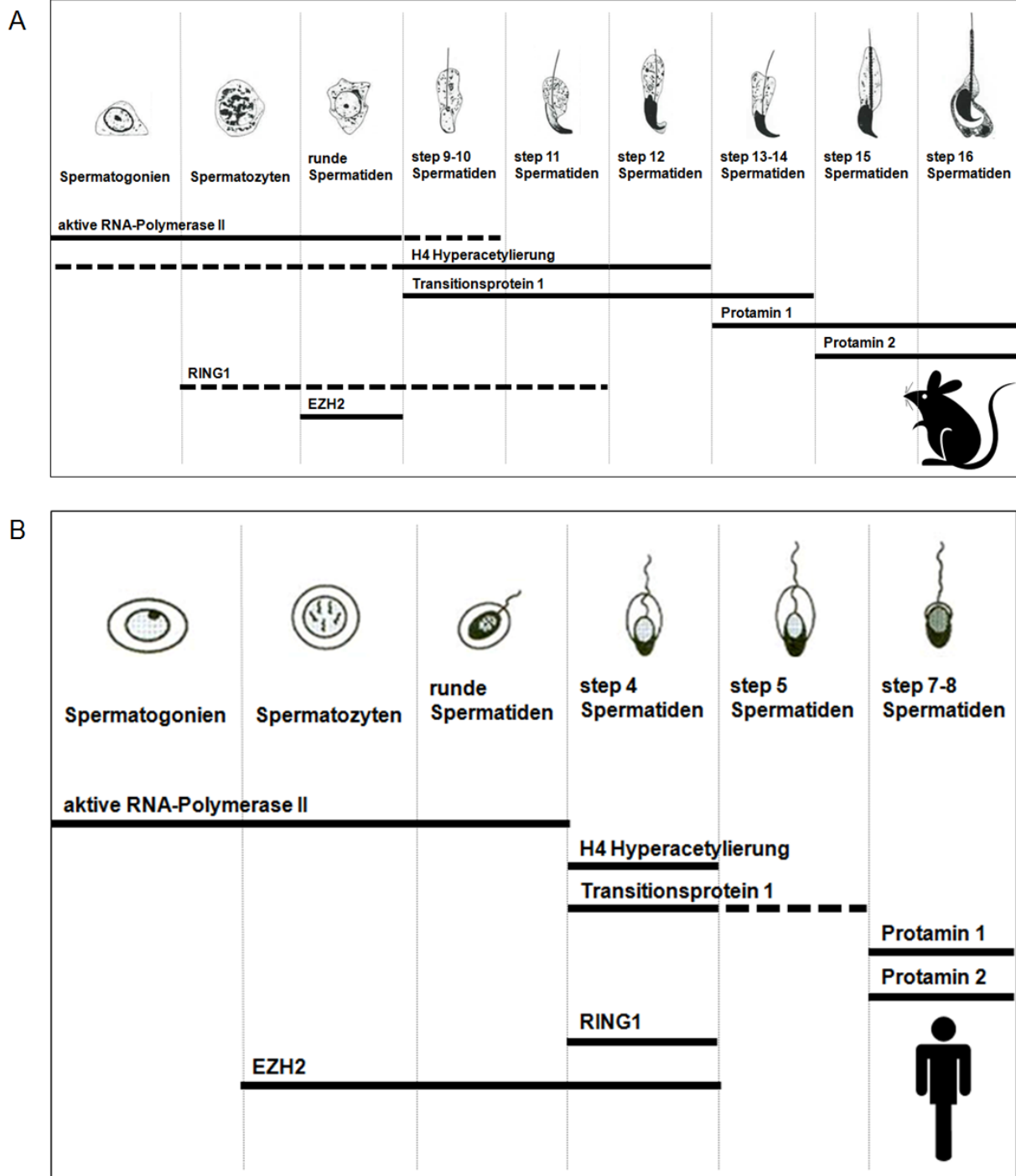


Abbildung 24: Zusammenfassung der Expression von RING1 und EZH2 im Testis

Schematische Darstellung der Expression von der PRC1-Untereinheit RING1 und der PRC2-Untereinheit EZH2 in den Keimzellen von Mäusen (A) und Menschen (B) im Vergleich zu der Expression von der aRNA-Pol II, H4ac, TNP1, PRM1 und PRM2. Die humanen step 6-Spermatiden sind nicht berücksichtigt worden, da dieses Stadium selten in humanen Testispräparaten vorzufinden ist. Modifiziert nach (Bergmann, 2009; Russell *et al.*, 1990).

Die Expression von hEZH2 lässt die Annahme zu, dass auch PRC2 im humanen Testis in Spermatozyten und runden Spermatiden vorliegt und hier womöglich die Transkription meiotischer und post-meiotisch-relevanter Gene reprimiert. Auch hier steht die Analyse der Expression weitere PRC2-Untereinheiten noch aus, um diese Aussage zu überprüfen.

Im Widerspruch zu den präsentierten EZH2 Daten stehen die Publikationen von Margueron *et al.*, (2008)

und Bracken *et al.*, (2003), nach denen EZH2 primär in sich aktiv teilenden Zellen nachzuweisen ist. Die Korrelation zwischen EZH2-Expression und der Proliferationsaktivität der Zellen konnte hier nicht bestätigt werden, vielmehr wurde EZH2 in den eigenen Ansätzen auch in nicht proliferierenden Zellen (runden Spermatiden) detektiert. Entweder ist dieses Ereignis testisspezifisch, d. h. EZH2 ist nur im Testis (auch) in nicht proliferierenden Zellen exprimiert, oder der in den Experimenten eingesetzte Antikörper konnte nicht spezifisch zwischen EZH2 und EZH1 unterscheiden und band an beide Proteine. Eine unselektive Antikörperreaktion erscheint aktuell nicht plausibel. So wird abschließend von einer selektiven Antikörperbindung ausgegangen und vermutet, dass EZH2 tatsächlich in nicht proliferierenden Testis-Zellen vorkommt.

Zusätzlich wurden Immunmarkierungen gegen weitere Untereinheiten des PRC1 (CBX2, CBX8, SCMH1 und BMI1) und PRC2 (EED und SUZ12) durchgeführt. Mit den verwendeten Antikörpern konnte weder in Maus noch in Mensch ein Signal detektiert werden.

Aufgrund der Datenlage von EZH2 ist ein Transfer des von Chen *et al.*, (2005) entworfenen und kontrovers diskutierten Models (siehe Abschnitt 2.7) von *Drosophila* auf *Mammalia* unwahrscheinlich. Die in dieser Arbeit vorliegenden Resultate führen jedoch zu der Annahme, dass PRC1 und PRC2 möglicherweise alle Spermatogenese-relevanten Gene im Verlauf der Spermatidendifferenzierung supprimiert. Dieser Ansatz müsste jedoch weiter analysiert werden. Die Repression der post-meiotisch benötigten Gene bis zum hin zu den runden Spermatiden, wird wahrscheinlich von (einem) anderen Komplex(e) vermittelt.

7.7 In Mäusetestes könnten PRC1 und PRC2 an der Repression der Spermatogenesegene im Verlauf der runden Spermatiden beteiligt sein

Basierend auf der Proteinexpression von EZH2 und RING1 im murinen und humanen Testes wurde postuliert, dass die entsprechenden Komplexe PRC1 und PRC2 an der Repression aller Spermatogenesegene beteiligt sind und somit zum Erliegen der Transkription innerhalb der Spermiogenese beitragen könnten. Um dieser Aussage nach zu gehen sollte erforscht werden, ob auch die PRC1- und PRC2-Transkripte in den meiotischen und/oder post-meiotischen Keimzellen angereichert sind. Zur Klärung dieser Frage wurden qPCRs an murinen Testes mit unterschiedlicher Keimzellenzusammensetzung vorgenommen (siehe Abschnitt 6.9). Für die PRC1-Untereinheiten *Ring1*, *Bmi1* und *Scmh1* wurde eine signifikante Anreicherung in Spermatozyten (16 dpp-Testis) und runden Spermatiden (25 dpp-Testis) nachgewiesen, die Transkripte der PRC1-Untereinheiten *Cbx2* und *Cbx8* waren dabei in Spermatozyten signifikant erhöht und in runden Spermatiden signifikant reduziert (siehe Abbildung 21). Da die Antikörpermarkierung gegen mRING1 eine konstante Färbung im Zytoplasma zeigte, jedoch das Transkript m*Ring1* in post-meiotischen Keimzellen signifikant angereichert ist scheint die Schlussfolgerung realistisch zu sein, dass das Signal von anti-RING1 in Maus nicht echt sein kann. Aufgrund der analogen Transkriptverteilung von *Ring1*, *Bmi1* und *Scmh1* könnten diese somit den Kernuntereinheiten des PRC1 im Mäusetestis zugeordnet werden. Umgekehrt, da

die Transkripte der Untereinheiten *Cbx2* und *Cbx8* in post-meiotischen Keimzellen vermindert vorlagen, liegt es nahe, dass diese nicht zu den Untereinheiten des PRC1 zählen. Darüber hinaus ist in Betracht zu ziehen, dass die einzelnen Untereinheiten auch außerhalb des PRC1 fungieren können und deswegen eine andere Transkriptverteilung aufweisen, obwohl diese im gleichen Komplex sitzen. Um zu überprüfen, ob PRC1 u. a. aus den Untereinheiten RING1, BMI1 und SCMH1 aufgebaut ist, könnten Co-Immunpräzipitationen durchgeführt werden. Die Detektion von *Ring1*, *Bmi1* und *Scmh1* in meiotischen und post-meiotischen Keimzellen indiziert dass die entsprechenden Proteine vermutlich vor allen in diesen Keimzellen benötigt werden. Prinzipiell wäre PRC1 in die Repression meiotisch und post-meiotisch relevanter Gene funktionell integriert. Da die Transkription im Verlauf der Spermiogenese zum Erliegen kommt, werden möglicherweise alle Spermatogenese-relevanten Gene im Verlauf dieser Phase reprimiert. Mittels Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) mit entsprechenden Primern könnte genauer evaluiert werden, welche Gene (z. B. meiotisch und/oder post-meiotisch relevante Gene) von PRC1 reprimiert werden.

In Bezug auf die analysierten PRC2-Untereinheiten konnte lediglich *Ezh2* einen signifikanten Transkriptionsanstieg in runden Spermatiden verzeichnen. In Anbetracht der Transkriptverteilung von *mEzh2* wurde erwartet, dass das entsprechende Protein mEZH2 bereits in Spermatozyten exprimiert wird. mEZH2 konnte jedoch nur in runden Spermatiden detektiert werden. Entweder wird mEZH2 im murinen Testis erst in runden Spermatiden exprimiert oder mEZH2 ist in früheren Keimzellen (Spermatogonien, Spermatozyten) nur in so geringen Mengen vorhanden, dass das Protein nicht hinreichend vom verwendeten Antikörper markiert werden konnte. Die Zunahme von *Ezh2* lässt sich in dem Sinne interpretieren, dass EZH2 unabhängig von PRC2 fungiert, z. B. bei der Umstrukturierung des Chromatins während der Spermiogenese. Tatsächlich ist beschrieben, dass EZH2 mit der testisspezifischen Histonvariante H1t2 in runden Spermatiden interagiert (Lambrot *et al.*, 2012). Die Untereinheiten *Eed* und *Suz12* wurden relativ konstant in allen Keimzellen transkribiert (siehe Abbildung 21). Möglicherweise ist der PRC2-Komplex im Testis von Mäusen u. a. aus den klassischen Kernuntereinheiten EZH2, EED und SUZ12 zusammengesetzt. Die relativ unveränderte Transkriptverteilung von *Eed* und *Suz12* liefert einen Hinweis darauf, dass die entsprechenden Proteine und somit auch PRC2 konstant in allen Keimzellen vorliegt. Auch diese Annahme könnte mittels Co-Immunpräzipitation überprüft werden.

Um jedoch konkretere Angaben über die genaue Zusammensetzung des PRC1 und PRC2 im murinen Testis machen zu können, müssten auch die anderen möglichen PRC1 und PRC2-Untereinheiten im murinen Testis auf Transkript- und Proteinebene analysiert werden. Um herauszufinden welche Transkripte der PRC1- und PRC2-Untereinheiten im humanen Testis synthetisiert werden, könnten u. a. *in-situ* Hybridisierung mit spezifischen Sonden durchgeführt werden.

Fasst man die Daten der PRC1- und PRC2-Transkripte zusammen konnte beobachtet werden, dass diese wie auch einige BRD-Transkripte (z. B. mBRD8, mTIF1α) zum Großteil in meiotischen und post-meiotischen Keimzellen angereichert sind. Geht man davon aus, dass u. a. diese BRD-Proteine in diesen Keimzellen zum

Anstieg der Transkription beitragen, ist es erforderlich die Transkription im Weiteren Verlauf der Spermatidendifferenzierung wieder still zu legen. Die Resultate der PRC1- und PRC2-Transkriptverteilung legen nahe, dass diese Komplexe (PRC1, PRC2) in meiotischen und post-meiotischen Keimzellen neu synthetisiert werden, um zum Transkriptionsstop während der Spermiogenese beizutragen.

7.8 Ausblick

Wie in der Einleitung erwähnt kommt die Transkription im Verlauf der Spermatidendifferenzierung im Säugerhoden zum Erliegen (siehe Abschnitt 2.4). Das bedeutet, dass alle Spermiogenese-relevanten Transkripte bereits in runden Spermatiden transkribiert, posttranslational reprimiert und im Verlauf der Spermiogenese bei Bedarf selektiv translatiert werden. Aufgrund der in dieser Arbeit vorgelegten Daten wird postuliert, dass die BRD-Proteine mBRD2, BRD8 und mTIF1 α an der Transkription meiotischer und post-meiotischer Gene beteiligt sein könnten. Vertiefende Studien sind nötig um herauszuarbeiten, ob diese BRD-Proteine tatsächlich am Promotor meiotisch und post-meiotisch relevanter Gene binden. Hierzu bietet sich die Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) an.

Möglicherweise existiert im Testis von *Mammalia* ein Komplex aus BRD-Proteinen und TAFs, die transkriptionsaktivierende Proteine zum Chromatin rekrutieren und somit die Transkription dieser Gene einleiten. Eine Interaktion mit TAF7L (Pointud *et al.*, 2003), TAF4b (Falender *et al.*, 2005), TAF2, TAF5 und TAF6 (Doktorarbeit: Elisabeth Klaus 2015, Philipps-Universität Marburg, bisher unveröffentlichte Daten) sowie mBRD2, BRD8 und mTIF1 α ist dabei aufgrund der gleichen zellulären Lokalisation nicht auszuschließen. Um dieser Thematik nachzugehen, könnten Interaktionstest von mBRD2, BRD8 und mTIF1 α mit TAFs mittels des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems oder Co-Immunoprecipitation durchgeführt werden.

Im weiteren Teil dieser Arbeit konnte belegt werden, dass die Transkripte ausgewählter PRC1 und PRC2-Untereinheiten im Testis von Mäusen vorkommen, mit der Schlussfolgerung, PRC1 setzte sich womöglich aus den Untereinheiten RING1, BMI1 und SCMH1 zusammen und PRC2 baue sich aus den Untereinheiten EZH2, EED und SUZ12 auf. Um die genaue Zusammensetzung dieser Komplexe zu ermitteln, müssten alle potenziellen Untereinheiten des PRC1 und PRC2 im Testis von *Mammalia* untersucht werden. Methodisch bieten sich Co-Immunpräzipitation an um zu belegen, dass diese Untereinheiten auch wirklich in einen Komplex eingebunden sind. Auch hier könnte mittels Chromatin-Immunpräzipitation analysiert werden, an welchen Promotoren die Untereinheiten des PRC1 und PRC2 binden um vielleicht Rückschlüsse zu ziehen, ob bestimmte Gene-Cluster (z. B. meiotisch relevante Gene) von diesen reprimiert werden.

8 Literatur

- Alastalo, T.-P., M. Lönnström, et al. (1998). "Stage-Specific Expression and Cellular Localization of the Heat Shock Factor 2 Isoforms in the Rat Seminiferous Epithelium." *Experimental Cell Research* 240(1): 16-27.
- Artimo, P., M. Jonnalagedda, et al. (2012). "ExPASy: SIB bioinformatics resource portal." *Nucleic Acids Res* 40(Web Server issue): W597-603.
- Baarends, W. M., J. W. Hoogerbrugge, et al. (1999). "Histone ubiquitination and chromatin remodeling in mouse spermatogenesis." *Developmental biology* 207(2): 322-333.
- Balhorn, R. (2007). "The protamine family of sperm nuclear proteins." *Genome Biol* 8(9): 227.
- Barckmann, B., X. Chen, et al. (2013). "Three levels of regulation lead to protamine and Mst77F expression in *Drosophila*." *Dev Biol* 377(1): 33-45.
- Barda, S., G. Paz, et al. (2012). "Expression of BET genes in testis of men with different spermatogenic impairments." *Fertil Steril* 97(1): 46-52 e45.
- Bergmann, M. (2005). "Spermatogenesis-physiology and pathophysiology." *Urologe A* 44(10): 1131-1132, 1134-1138.
- Bergmann, M. (2009). *Biopsie und Histologie der Hoden. Andrologie*, Springer: 161-172.
- Blake, J. A., J. E. Richardson, et al. (2002). "The Mouse Genome Database (MGD): the model organism database for the laboratory mouse." *Nucleic acids research* 30(1): 113-115.
- Bönisch, C. and S. B. Hake (2012). "Histone H2A variants in nucleosomes and chromatin: more or less stable?" *Nucleic acids research* 40(21): 10719-10741.
- Bracken, A. P., D. Pasini, et al. (2003). "EZH2 is downstream of the pRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer." *The EMBO journal* 22(20): 5323-5335.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Braun, R. E. (2001). "Packaging paternal chromosomes with protamine." *Nat Genet* 28(1): 10-12.
- Brookes, E., I. de Santiago, et al. (2012). "Polycomb associates genome-wide with a specific RNA polymerase II variant, and regulates metabolic genes in ESCs." *Cell Stem Cell* 10(2): 157-170.
- Brunner, A. M., P. Nanni, et al. (2014). "Epigenetic marking of sperm by post-translational modification of histones and protamines." *Epigenetics Chromatin* 7(1): 2.
- Burke, T. W. and J. T. Kadonaga (1997). "The downstream core promoter element, DPE, is conserved from *Drosophila* to humans and is recognized by TAFII60 of *Drosophila*." *Genes & development* 11(22): 3020-3031.
- Cai, Y., J. Jin, et al. (2003). "Identification of new subunits of the multiprotein mammalian TRRAP/TIP60-containing histone acetyltransferase complex." *J Biol Chem* 278(44): 42733-42736.
- Cao, R., L. Wang, et al. (2002). "Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing."

-
- Science 298(5595): 1039-1043.
- Chen, H. Y., J.-M. Sun, et al. (1998). "Ubiquitination of histone H3 in elongating spermatids of rat testes." *Journal of Biological Chemistry* 273(21): 13165-13169.
- Chen, X., M. Hiller, et al. (2005). "Tissue-specific TAFs counteract Polycomb to turn on terminal differentiation." *Science* 310(5749): 869-872.
- Cheng, Y., M. G. Buffone, et al. (2007). "Abnormal sperm in mice lacking the *Taf7l* gene." *Mol Cell Biol* 27(7): 2582-2589.
- Chi, T. (2004). "A BAF-centred view of the immune system." *Nat Rev Immunol* 4(12): 965-977.
- Chomczynski, P. and N. Sacchi (2006). "The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on." *Nat Protoc* 1(2): 581-585.
- Choudhary, C., C. Kumar, et al. (2009). "Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions." *Science* 325(5942): 834-840.
- Christensen, J. H., B. Elfving, et al. (2012). "The Schizophrenia and Bipolar Disorder associated *BRD1* gene is regulated upon chronic restraint stress." *Eur Neuropsychopharmacol* 22(9): 651-656.
- Clarkson, M. J., J. R. Wells, et al. (1999). "Regions of variant histone *His2AvD* required for *Drosophila* development." *Nature* 399(6737): 694-697.
- Clermont, Y. (1963). "The cycle of the seminiferous epithelium in man." *Am J Anat* 112: 35-51.
- Connolly, C. M. and R. E. Braun (2009). *The Mammalian Reproductive Genetics Database. Biology of reproduction, Soc Study Reprod.*
- Cooke, H. J. and P. T. Saunders (2002). "Mouse models of male infertility." *Nat Rev Genet* 3(10): 790-801.
- Czermin, B., R. Melfi, et al. (2002). "Drosophila Enhancer of Zeste/ESC Complexes Have a Histone H3 Methyltransferase Activity that Marks Chromosomal Polycomb Sites." *Cell* 111(2): 185-196.
- da Silva, S. M., A. Hacker, et al. (1996). "Sox9 expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in testis differentiation in mammals and birds." *Nature genetics* 14(1): 62-68.
- Dadoune, J. P. (2003). "Expression of mammalian spermatozoal nucleoproteins." *Microscopy research and technique* 61(1): 56-75.
- De Vries, M., L. Ramos, et al. (2012). "Chromatin remodelling initiation during human spermiogenesis." *Biol Open* 1(5): 446-457.
- Deato, M. D. E. and R. Tjian (2007). "Switching of the core transcription machinery during myogenesis." *Genes & development* 21(17): 2137-2149.
- Dey, A., F. Chitsaz, et al. (2003). "The double bromodomain protein *Brd4* binds to acetylated chromatin during interphase and mitosis." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100(15): 8758-8763.
- Dey, A., J. Ellenberg, et al. (2000). "A bromodomain protein, *MCAP*, associates with mitotic chromosomes and affects G2-to-M transition." *Molecular and cellular biology* 20(17): 6537-6549.
- Dey, A., A. Nishiyama, et al. (2009). "*Brd4* marks select genes on mitotic chromatin and directs postmitotic transcription." *Mol Biol Cell* 20(23): 4899-4909.
-

-
- Dottermusch-Heidel, C., S. M. Gartner, et al. (2014a). "H3K79 methylation: a new conserved mark that accompanies H4 hyperacetylation prior to histone-to-protamine transition in *Drosophila* and rat." *Biol Open*.
- Dottermusch-Heidel, C., E. S. Klaus, et al. (2014b). "H3K79 methylation directly precedes the histone-to-protamine transition in mammalian spermatids and is sensitive to bacterial infections." *Andrology*.
- El-Sharnouby, S., J. Redhouse, et al. (2013). "Genome-Wide and Cell-Specific Epigenetic Analysis Challenges the Role of Polycomb in *Drosophila* Spermatogenesis." *PLoS genetics* 9(10): e1003842.
- Endoh, M., T. A. Endo, et al. (2012). "Histone H2A mono-ubiquitination is a crucial step to mediate PRC1-dependent repression of developmental genes to maintain ES cell identity." *PLoS genetics* 8(7): e1002774.
- Eskeland, R., M. Leeb, et al. (2010). "Ring1B compacts chromatin structure and represses gene expression independent of histone ubiquitination." *Molecular cell* 38(3): 452-464.
- Faast, R., V. Thonglairoam, et al. (2001). "Histone variant H2A. Z is required for early mammalian development." *Current Biology* 11(15): 1183-1187.
- Falender, A. E., R. N. Freiman, et al. (2005). "Maintenance of spermatogenesis requires TAF4b, a gonad-specific subunit of TFIID." *Genes Dev* 19(7): 794-803.
- Filippakopoulos, P. and S. Knapp (2012). "The bromodomain interaction module." *FEBS Lett* 586(17): 2692-2704.
- Fischle, W., Y. Wang, et al. (2003). "Molecular basis for the discrimination of repressive methyl-lysine marks in histone H3 by Polycomb and HP1 chromodomains." *Genes & development* 17(15): 1870-1881.
- Flicek, P., M. R. Amode, et al. (2011). "Ensembl 2012." *Nucleic acids research*: gkr991.
- Florence, B. and D. V. Faller (2001). "You bet-cha: a novel family of transcriptional regulators." *Front Biosci* 6: D1008-1018.
- França, L. and L. Russell (1998). "The testis of domestic animals." *Male reproduction: a multidisciplinary overview*: 198-219.
- Francis, N. J., R. E. Kingston, et al. (2004). "Chromatin compaction by a polycomb group protein complex." *Science* 306(5701): 1574-1577.
- Freiman, R. N., S. R. Albright, et al. (2001). "Requirement of tissue-selective TBP-associated factor TAFII105 in ovarian development." *Science* 293(5537): 2084-2087.
- Gaucher, J., F. Boussouar, et al. (2012). "Bromodomain-dependent stage-specific male genome programming by Brdt." *EMBO J* 31(19): 3809-3820.
- Godmann, M., V. Auger, et al. (2007). "Dynamic regulation of histone H3 methylation at lysine 4 in mammalian spermatogenesis." *Biology of reproduction* 77(5): 754-764.
- Greaves, I. K., D. Rangasamy, et al. (2006). "The X and Y chromosomes assemble into H2A.Z-containing [corrected] facultative heterochromatin [corrected] following meiosis." *Mol Cell Biol* 26(14): 5394-5405.
-

-
- Grimes Jr, S. R. and N. Henderson (1984). "Hyperacetylation of histone H4 in rat testis spermatids." *Experimental Cell Research* 152(1): 91-97.
- Hansen, K. H., A. P. Bracken, et al. (2008). "A model for transmission of the H3K27me3 epigenetic mark." *Nature cell biology* 10(11): 1291-1300.
- Harte, M. T., G. J. O'Brien, et al. (2010). "BRD7, a subunit of SWI/SNF complexes, binds directly to BRCA1 and regulates BRCA1-dependent transcription." *Cancer research* 70(6): 2538-2547.
- Heller, C. H. and Y. Clermont (1964). "Kinetics of the germinal epithelium in man." *Recent Prog Horm Res* 20: 545-575.
- Hess, R. A. and L. Renato de Franca (2008). "Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium." *Adv Exp Med Biol* 636: 1-15.
- Higuchi, R., C. Fockler, et al. (1993). "Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions." *Biotechnology (N Y)* 11(9): 1026-1030.
- Hiller, M., X. Chen, et al. (2004). "Testis-specific TAF homologs collaborate to control a tissue-specific transcription program." *Development* 131(21): 5297-5308.
- Hiller, M. A., T. Y. Lin, et al. (2001). "Developmental regulation of transcription by a tissue-specific TAF homolog." *Genes Dev* 15(8): 1021-1030.
- Hogarth, C. A. and M. D. Griswold (2010). "The key role of vitamin A in spermatogenesis." *J Clin Invest* 120(4): 956-962.
- Houzelstein, D., S. L. Bullock, et al. (2002). "Growth and early postimplantation defects in mice deficient for the bromodomain-containing protein Brd4." *Mol Cell Biol* 22(11): 3794-3802.
- Janning, W. and E. Knust (2008). *Genetik: Allgemeine Genetik-Molekulare Genetik-Entwicklungsgenetik*, Georg Thieme Verlag.
- Jayaramaiah-Raja, S. and R. Renkawitz-Pohl (2005). "Replacement by *Drosophila melanogaster* protamines and Mst77F of histones during chromatin condensation in late spermatids and role of sesame in the removal of these proteins from the male pronucleus." *Molecular and cellular biology* 25(14): 6165-6177.
- Johnson, L., P. K. Chaturvedi, et al. (1992). "Missing generations of spermatocytes and spermatids in seminiferous epithelium contribute to low efficiency of spermatogenesis in humans." *Biol Reprod* 47(6): 1091-1098.
- Kadoch, C., D. C. Hargreaves, et al. (2013). "Proteomic and bioinformatic analysis of mammalian SWI/SNF complexes identifies extensive roles in human malignancy." *Nat Genet* 45(6): 592-601.
- Kaesler, M. D., A. Aslanian, et al. (2008). "BRD7, a novel PBAF-specific SWI/SNF subunit, is required for target gene activation and repression in embryonic stem cells." *Journal of Biological Chemistry* 283(47): 32254-32263.
- Kanno, T., Y. Kanno, et al. (2004). "Selective recognition of acetylated histones by bromodomain proteins visualized in living cells." *Molecular cell* 13(1): 33-43.
-

-
- Kibbe, W. A. (2007). "OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator." *Nucleic acids research* 35(suppl 2): W43-W46.
- Kierszenbaum, A. and L. L. Tres (1975). "Structural and transcriptional features of the mouse spermatid genome." *The Journal of cell biology* 65(2): 258-270.
- Kim, T. H., L. O. Barrera, et al. (2005). "A high-resolution map of active promoters in the human genome." *Nature* 436(7052): 876-880.
- Kim, Y.-J., I. Hwang, et al. (1987). "Molecular cloning and differential expression of somatic and testis-specific H2B histone genes during rat spermatogenesis." *Developmental biology* 124(1): 23-34.
- Kouzarides, T. (2000). "Acetylation: a regulatory modification to rival phosphorylation?" *The EMBO journal* 19(6): 1176-1179.
- Kouzarides, T. (2007). "Chromatin modifications and their function." *Cell* 128(4): 693-705.
- Kowalski, A. and J. Pałyga (2012). "Linker histone subtypes and their allelic variants." *Cell biology international* 36(11): 981-996.
- Krebs, A. R., K. Karmodiya, et al. (2011). "SAGA and ATAC histone acetyl transferase complexes regulate distinct sets of genes and ATAC defines a class of p300-independent enhancers." *Mol Cell* 44(3): 410-423.
- Kuzmichev, A., K. Nishioka, et al. (2002). "Histone methyltransferase activity associated with a human multiprotein complex containing the Enhancer of Zeste protein." *Genes & development* 16(22): 2893-2905.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227(5259): 680-685.
- Lambrot, R., S. Jones, et al. (2012). "Specialized distribution of the histone methyltransferase Ezh2 in the nuclear apical region of round spermatids and its interaction with the histone variant H1t2." *J Androl* 33(5): 1058-1066.
- Larkin, M. A., G. Blackshields, et al. (2007). "Clustal W and Clustal X version 2.0." *Bioinformatics* 23(21): 2947-2948.
- Leduc, F., V. Maquennehan, et al. (2008). "DNA damage response during chromatin remodeling in elongating spermatids of mice." *Biology of reproduction* 78(2): 324-332.
- Lee, D.-H., N. Gershenzon, et al. (2005). "Functional characterization of core promoter elements: the downstream core element is recognized by TAF1." *Molecular and cellular biology* 25(21): 9674-9686.
- LeRoy, G., B. Rickards, et al. (2008). "The double bromodomain proteins Brd2 and Brd3 couple histone acetylation to transcription." *Mol Cell* 30(1): 51-60.
- Leser, K., S. Awe, et al. (2012). "The bromodomain-containing protein tBRD-1 is specifically expressed in spermatocytes and is essential for male fertility." *Biol Open* 1(6): 597-606.
- Luger, K., A. W. Mäder, et al. (1997). "Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution." *Nature* 389(6648): 251-260.
-

-
- Magrane, M. and U. Consortium (2011). "UniProt Knowledgebase: a hub of integrated protein data." Database 2011: bar009.
- Malik, H. S. and S. Henikoff (2003). "Phylogenomics of the nucleosome." *Nature structural & molecular biology* 10(11): 882-891.
- Margueron, R., N. Justin, et al. (2009). "Role of the polycomb protein EED in the propagation of repressive histone marks." *Nature* 461(7265): 762-767.
- Margueron, R., G. Li, et al. (2008). "Ezh1 and Ezh2 maintain repressive chromatin through different mechanisms." *Molecular cell* 32(4): 503-518.
- Margueron, R. and D. Reinberg (2011). "The Polycomb complex PRC2 and its mark in life." *Nature* 469(7330): 343-349.
- Martianov, I., S. Brancorsini, et al. (2005). "Polar nuclear localization of H1T2, a histone H1 variant, required for spermatid elongation and DNA condensation during spermiogenesis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(8): 2808-2813.
- Marushige, K. (1976). "Activation of chromatin by acetylation of histone side chains." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 73(11): 3937-3941.
- Matangkasombut, O., R. M. Buratowski, et al. (2000). "Bromodomain factor 1 corresponds to a missing piece of yeast TFIID." *Genes & development* 14(8): 951-962.
- McCullagh, P., T. Chaplin, et al. (1999). "The cloning, mapping and expression of a novel gene, BRL, related to the AF10 leukaemia gene." *Oncogene* 18(52): 7442-7452.
- McEntyre, J. and D. Lipman (2001). "PubMed: bridging the information gap." *Canadian Medical Association Journal* 164(9): 1317-1319.
- McPherson, S. and F. Longo (1992). "Chromatin structure-function alterations during mammalian spermatogenesis: DNA nicking and repair in elongating spermatids." *European journal of histochemistry: EJH* 37(2): 109-128.
- Meistrich, M. L. and R. A. Hess (2013). "Assessment of spermatogenesis through staging of seminiferous tubules." *Methods Mol Biol* 927: 299-307.
- Meistrich, M. L., B. Mohapatra, et al. (2003). "Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis." *Chromosoma* 111(8): 483-488.
- Metcalf, C. E. and D. A. Wassarman (2007). "Nucleolar colocalization of TAF1 and testis-specific TAFs during *Drosophila* spermatogenesis." *Developmental Dynamics* 236(10): 2836-2843.
- Min, J., Y. Zhang, et al. (2003). "Structural basis for specific binding of Polycomb chromodomain to histone H3 methylated at Lys 27." *Genes & development* 17(15): 1823-1828.
- Monesi, V. (1965). "Differential rate of ribonucleic acid synthesis in the autosomes and sex chromosomes during male meiosis in the mouse." *Chromosoma* 17(1): 11-21.
- Morinière, J., S. Rousseaux, et al. (2009). "Cooperative binding of two acetylation marks on a histone tail by a single bromodomain." *Nature* 461(7264): 664-668.
-

-
- Moriniere, J., S. Rousseaux, et al. (2009). "Cooperative binding of two acetylation marks on a histone tail by a single bromodomain." *Nature* 461(7264): 664-668.
- Mulisch, M. and U. Welsch (2010). *Romeis - Mikroskopische Technik*, Spektrum Akademischer Verlag.
- Müller, J., C. M. Hart, et al. (2002). "Histone Methyltransferase Activity of a Drosophila Polycomb Group Repressor Complex." *Cell* 111(2): 197-208.
- Mullis, K., F. Faloona, et al. (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1: 263-273.
- Niederreither, K., E. Remboutsika, et al. (1999). "Expression of the transcriptional intermediary factor TIF1alpha during mouse development and in the reproductive organs." *Mech Dev* 88(1): 111-117.
- Paillisson, A., A. Levasseur, et al. (2007). "Bromodomain testis-specific protein is expressed in mouse oocyte and evolves faster than its ubiquitously expressed paralogs BRD2, -3, and -4." *Genomics* 89(2): 215-223.
- Pasini, D., A. P. Bracken, et al. (2004). "Suz12 is essential for mouse development and for EZH2 histone methyltransferase activity." *EMBO J* 23(20): 4061-4071.
- Pivot-Pajot, C., C. Caron, et al. (2003). "Acetylation-dependent chromatin reorganization by BRDT, a testis-specific bromodomain-containing protein." *Mol Cell Biol* 23(15): 5354-5365.
- Pointud, J. C., G. Mengus, et al. (2003). "The intracellular localisation of TAF7L, a paralogue of transcription factor TFIID subunit TAF7, is developmentally regulated during male germ-cell differentiation." *J Cell Sci* 116(Pt 9): 1847-1858.
- Poirier, G. L., K. L. Shires, et al. (2008). "Anterior thalamic lesions produce chronic and profuse transcriptional de-regulation in retrosplenial cortex: A model of retrosplenial hypoactivity and covert pathology." *Thalamus Relat Syst* 4(1): 59-77.
- Rathke, C., W. M. Baarends, et al. (2014). "Chromatin dynamics during spermiogenesis." *Biochim Biophys Acta* 1839(3): 155-168.
- Reina, J. H. and N. Hernandez (2007). "On a roll for new TRF targets." *Genes & development* 21(22): 2855-2860.
- Renkawitz-Pohl, R., M. Hollmann, et al. (2005). "Spermatogenesis." *Comprehensive molecular insect science* 1: 157-178.
- Reyes, J., J. Barra, et al. (1998). "Altered control of cellular proliferation in the absence of mammalian brahma (SNF2 α)." *The EMBO journal* 17(23): 6979-6991.
- Russell, L., R. Ettlin, et al. (1990). "Histopathology of the testis." *Histological and histopathological evaluation of the testis*: 210-266.
- Russell, L. and B. Frank (1978). "Characterization of rat spermatocytes after plastic embedding." *Systems Biology in Reproductive Medicine* 1(1): 5-18.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, et al. (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." *Science* 239(4839): 487-491.
-

-
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, et al. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold spring harbor laboratory press New York.
- Satijn, D., M. J. Gunster, et al. (1997). "RING1 is associated with the polycomb group protein complex and acts as a transcriptional repressor." *Molecular and cellular biology* 17(7): 4105-4113.
- Schafer, M., K. Nayernia, et al. (1995). "Translational control in spermatogenesis." *Dev Biol* 172(2): 344-352.
- Scheuermann, J. C., L. Gutiérrez, et al. (2012). "Histone H2A monoubiquitination and Polycomb repression." *Fly* 6(3): 162-168.
- Schuettengruber, B., D. Chourrout, et al. (2007). "Genome regulation by polycomb and trithorax proteins." *Cell* 128(4): 735-745.
- Schultz, N., F. K. Hamra, et al. (2003). "A multitude of genes expressed solely in meiotic or postmeiotic spermatogenic cells offers a myriad of contraceptive targets." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100(21): 12201-12206.
- Shang, E., H. D. Nickerson, et al. (2007). "The first bromodomain of Brdt, a testis-specific member of the BET sub-family of double-bromodomain-containing proteins, is essential for male germ cell differentiation." *Development* 134(19): 3507-3515.
- Shang, E., G. Salazar, et al. (2004). "Identification of unique, differentiation stage-specific patterns of expression of the bromodomain-containing genes Brd2, Brd3, Brd4, and Brdt in the mouse testis." *Gene Expr Patterns* 4(5): 513-519.
- Sikorski, T. W. and S. Buratowski (2009). "The basal initiation machinery: beyond the general transcription factors." *Curr Opin Cell Biol* 21(3): 344-351.
- Simon, J. A. and R. E. Kingston (2013). "Occupying chromatin: Polycomb mechanisms for getting to genomic targets, stopping transcriptional traffic, and staying put." *Molecular cell* 49(5): 808-824.
- Song, N., J. Liu, et al. (2011). "Immunohistochemical analysis of histone H3 modifications in germ cells during mouse spermatogenesis." *Acta histochemica et cytochemica* 44(4): 183.
- Sonnack, V., K. Failing, et al. (2002). "Expression of hyperacetylated histone H4 during normal and impaired human spermatogenesis." *Andrologia* 34(6): 384-390.
- Steger, K. (1999). "Transcriptional and translational regulation of gene expression in haploid spermatids." *Anatomy and embryology* 199(6): 471-487.
- Steger, K. (2001). "Haploid spermatids exhibit translationally repressed mRNAs." *Anat Embryol (Berl)* 203(5): 323-334.
- Steilmann, C., A. Paradowska, et al. (2011). "Presence of histone H3 acetylated at lysine 9 in male germ cells and its distribution pattern in the genome of human spermatozoa." *Reproduction, Fertility and Development* 23(8): 997-1011.
- Stock, J. K., S. Giadrossi, et al. (2007). "Ring1-mediated ubiquitination of H2A restrains poised RNA polymerase II at bivalent genes in mouse ES cells." *Nature cell biology* 9(12): 1428-1435.
- Student (1908). "The probable error of a mean." *Biometrika*: 1-25.
-

-
- Talbert, P. B. and S. Henikoff (2010). "Histone variants—ancient wrap artists of the epigenome." *Nature reviews Molecular cell biology* 11(4): 264-275.
- Tan, M., H. Luo, et al. (2011). "Identification of 67 histone marks and histone lysine crotonylation as a new type of histone modification." *Cell* 146(6): 1016-1028.
- Tanaka, H., N. Iguchi, et al. (2005). "HANP1/H1T2, a novel histone H1-like protein involved in nuclear formation and sperm fertility." *Molecular and cellular biology* 25(16): 7107-7119.
- Tanphaichitr, N., P. Sobhon, et al. (1978). "Basic nuclear proteins in testicular cells and ejaculated spermatozoa in man." *Experimental Cell Research* 117(2): 347-356.
- Theofel, I., M. Bartkuhn, et al. (2014). "tBRD-1 Selectively Controls Gene Activity in the *Drosophila* Testis and Interacts with Two New Members of the Bromodomain and Extra-Terminal (BET) Family." *PLoS One* 9(9): e108267.
- Thomas, M. C. and C.-M. Chiang (2006). "The general transcription machinery and general cofactors." *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 41(3): 105-178.
- Towbin, H., T. Staehelin, et al. (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 76(9): 4350-4354.
- Trostle-Weige, P., M. Meistrich, et al. (1982). "Isolation and characterization of TH2A, a germ cell-specific variant of histone 2A in rat testis." *Journal of Biological Chemistry* 257(10): 5560-5567.
- Turner, B. M. (2005). "Reading signals on the nucleosome with a new nomenclature for modified histones." *Nature structural & molecular biology* 12(2): 110-112.
- Ullah, M., N. Pelletier, et al. (2008). "Molecular architecture of quartet MOZ/MORF histone acetyltransferase complexes." *Mol Cell Biol* 28(22): 6828-6843.
- Unni, E., A. Mayerhofer, et al. (1995). "Increased accessibility of the N-terminus of testis-specific histone TH2B to antibodies in elongating spermatids." *Molecular reproduction and development* 42(2): 210-219.
- Untergasser, A., I. Cutcutache, et al. (2012). "Primer3—new capabilities and interfaces." *Nucleic acids research* 40(15): e115-e115.
- Utakoji, T. (1966). "Chronology of nucleic acid synthesis in meiosis of the male Chinese hamster." *Exp Cell Res* 42(3): 585-596.
- Van der Heijden, G., A. Derijck, et al. (2006). "Transmission of modified nucleosomes from the mouse male germline to the zygote and subsequent remodeling of paternal chromatin." *Developmental biology* 298(2): 458-469.
- Van Rooijen, H., M. P. Ooms, et al. (1998). "Immunoexpression of testis-specific histone 2B in human spermatozoa and testis tissue." *Human Reproduction* 13(6): 1559-1566.
- Wang, J., H. Gu, et al. (2012). "Essential roles of the chromatin remodeling factor BRG1 in spermatogenesis in mice." *Biol Reprod* 86(6): 186.
-

- Weinbauer, G. F., C. M. Luetjens, et al. (2010). Physiology of testicular function. *Andrology*, Springer: 11-59.
- White-Cooper, H. and I. Davidson (2011). "Unique aspects of transcription regulation in male germ cells." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3(7).
- White-Cooper, H., M. Schafer, et al. (1998). "Transcriptional and post-transcriptional control mechanisms coordinate the onset of spermatid differentiation with meiosis I in *Drosophila*." *Development* 125(1): 125-134.
- Wu, S.-Y. and C.-M. Chiang (2007). "The double bromodomain-containing chromatin adaptor Brd4 and transcriptional regulation." *Journal of Biological Chemistry* 282(18): 13141-13145.
- Yang, Z., N. He, et al. (2008). "Brd4 recruits P-TEFb to chromosomes at late mitosis to promote G1 gene expression and cell cycle progression." *Molecular and cellular biology* 28(3): 967-976.
- Zhang, S., D. Li, et al. (2008). "Expression localization of Bmi1 in mice testis." *Mol Cell Endocrinol* 287(1-2): 47-56.
- Zhao, M., C. R. Shirley, et al. (2004a). "Transition nuclear proteins are required for normal chromatin condensation and functional sperm development." *Genesis* 38(4): 200-213.
- Zhao, M., C. R. Shirley, et al. (2004b). "Nucleoprotein transitions during spermiogenesis in mice with transition nuclear protein Tnp1 and Tnp2 mutations." *Biology of reproduction* 71(3): 1016-1025.
- Zhao, S., W. Xu, et al. (2010). "Regulation of cellular metabolism by protein lysine acetylation." *Science* 327(5968): 1000-1004.

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau und Organisation des Testis	3
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Spermatogenese in Mäusen	5
Abbildung 3: Stadien der murinen Spermatogenese	7
Abbildung 4: Die sechs Stadien der humanen Spermatogenese	9
Abbildung 5: Vergleich der Spermatogenese zwischen Mäusen und <i>Drosophila</i>	12
Abbildung 6: Model der TFIID initiierten Bildung des basalen Prä-Initiationskomplexes der RNA-Polymerase II	16
Abbildung 7: Modell der Transkriptionsregulation Spermiogenese-relevanter Gene in <i>Drosophila</i>	17
Abbildung 8: Modell für die Funktion von tBRD-1 - 3 und den tTAFs in primären Spermatozyten	18
Abbildung 9: Vergleichende Darstellung der Modelle für die Zusammensetzung der kanonischen PRC2 und PRC1 zwischen <i>Drosophila</i> und Mensch	20
Abbildung 10: Repräsentativer Transkriptnachweis von PRC-Untereinheiten	44
Abbildung 11: Schematische Darstellung der murinen Keimzellenzusammensetzung juveniler Testes im Alter von 7 dpp, 16 dpp und 25 dpp	47
Abbildung 12: In Mäusehoden sind einige BRD-Transkripte in meiotisch und post-meiotischen Keimzellen signifikant angereichert	49
Abbildung 13: Die Transkripte <i>Pcaf</i> , <i>Smarca2</i> und <i>Tif1a</i> sind signifikant in post-meiotischen Keimzellen angereichert	50
Abbildung 14: Immunoblots mit spezifischen Antikörpern gegen post-meiotisch signifikant angereicherte BRD-Proteine und den PRC-Untereinheiten RING1 und EZH2	51
Abbildung 15: Immunmarkierung an murinen Testes mit Markern für die Transkription und den Histon-Protamin-Wechsel	53
Abbildung 16: Immunmarkierung an humanen Testes mit Markern für die Transkription und dem Histon-Protamin-Wechsel	53
Abbildung 17: Die Expression der murinen BRD-Proteine decken sich größtenteils mit der aktiven RNA Polymerase II	56
Abbildung 18: Immunfärbung der post-meiotisch angereicherten BRD-Proteine in humanen Keimzellen	57
Abbildung 19: Immunmarkierung gegen RING1 und EZH2 im Mäusehoden	58
Abbildung 20: Expression von RING1 und EZH2 im humanen Testes	60
Abbildung 21: Transkriptverteilung klassischer Untereinheiten des PRC1 und PRC2 in murinen Testes mit unterschiedlicher Keimzellenzusammensetzung	59
Abbildung 22: Übersicht über die Markierungen mit Markern für die Transkription und den Histon-Protamin-Wechsel in Maus und Mensch	61
Abbildung 23: Übersicht der immunhistochemischen Markierung der untersuchten BRD-Proteine an murinen und humanen Testes	65
Abbildung 24: Zusammenfassung der Expression von RING1 und EZH2 im Testis	73
Abbildung 25: "Binary Decision Key" nach Meistrich und Hess 2013	88
Abbildung 26: Repräsentative Auswahl an RT-PCRs für Marker von verschiedenen Keimzellen an murinen Testes unterschiedlichen Alters	89
Abbildung 27: Coomassie-Färbung und Immunmarkierung eines 10 % SDS-Gels mit spezifischem Antikörper gegen AKTIN	90
Abbildung 28: Immunoblots gegen BRDT zeigen immer eine unterschiedliche Signalverteilung	91

10 Abkürzungsverzeichnis

C	Grad Celsius	RT-PCR	Reverse Transkriptase
A	Ampere		Polymerase-Kettenreaktion
Abb.	Abbildung	SDS	Natriumdodecylsulfat
APS	Ammoniumperoxidsulfat	SDS-PAGE	SDS-
AS	Aminosäure		Polyacrylamidgelelektrophorese
BD	Bromodomäne	Sek	Sekunden
bp	Basenpaare	TEMED	Tetramethylethyldiamin
BRD	Bromodomänen-Protein	T _m	Schmelztemperatur
DAB	3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride	U	Unit
ddH ₂ O	zweifach destilliertes Wasser	u. a.	unter anderem
DEPC	Diethyl pyrocarbonate	ü. N.	über Nacht
DNA	Desoxyribonukleinsäure	V	Volt
DMSO	Dimethylsulfoxid	v/v	Volumen pro Volumen
dpp	days post-partum	Vol.	Volumen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	w/v	Gewicht pro Volumen
<i>et.al.</i>	Et alli (lat.: und andere)	μ	Mikro (10) ⁻⁶
EtOH	Ethanol		
g	Gramm		
gDNA	genomische DNA		
h	Stunde(n)		
HCl	Salzsäure		
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid		
hBRD	humanes Bromodomänen-Protein		
HYP	Hypospermatogenese		
KAc	Kaliumacetat		
kb	Kilobasen		
kDa	Kilodalton		
l	Liter		
m	Milli (10) ⁻³		
M	Molar (mol/l)		
mBRD	murines Bromodomänen-Protein		
Min	Minuten		
mRNA	„messenger“ RNA		
MW	Molekulargewicht		
n	Nano (10) ⁻⁹		
NSP	normaler Spermatogenese		
NaCl	Natriumchlorid		
NaOH	Natriumhydroxid		
PRC	Polycomb-Repressions-Komplex		
qPCR	Quantitative Echtzeit Polymerase- Kettenreaktion		
RNA	Ribonukleinsäure		
rpm	runden pro Minute		
RT	Raumtemperatur		

11 Anhang

A „Binary Decision Key for Staging in the Mouse“ von Meistrich und Hess 2013

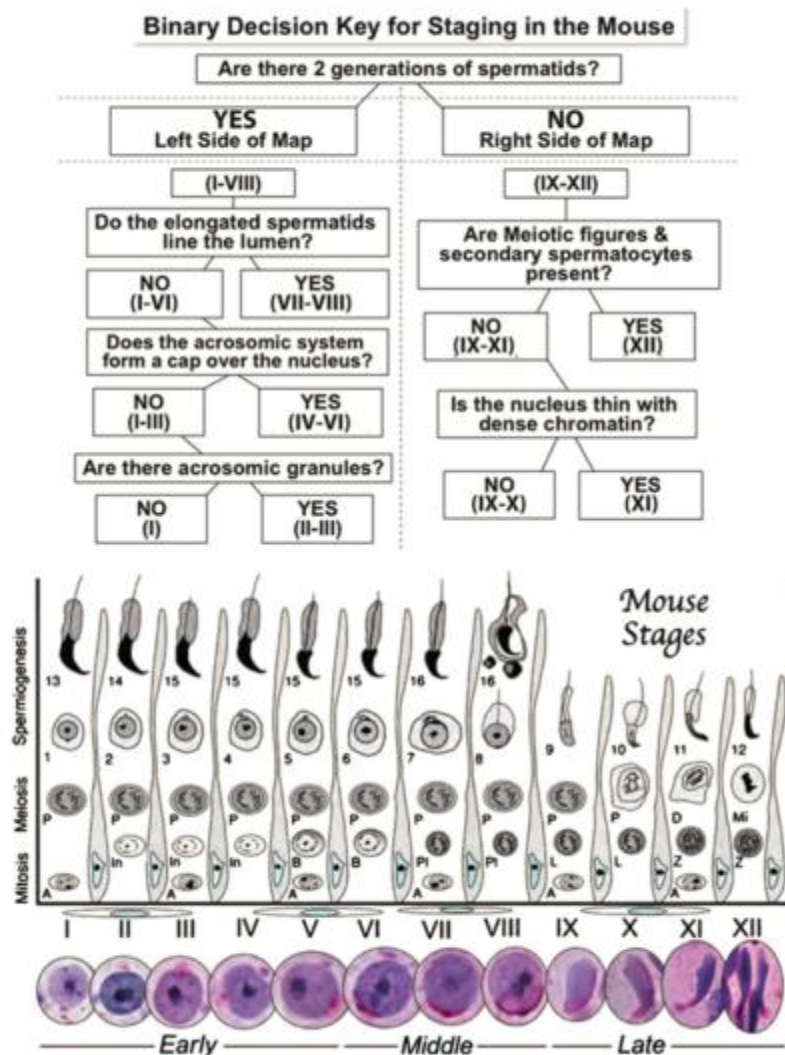


Abbildung 25: "Binary Decision Key" nach Meistrich und Hess 2013

Dieser Fragebogen ermöglicht eine schnelle und präzise Klassifizierung der Spermatogenese-Stadien der Maus. Zuerst wird bestimmt ob in dem Keimtubulus eine Generation an Spermatiden (runde oder elongierte Spermatiden) oder zwei Generationen an Spermatiden (runde und elongierte Spermatiden) vorhanden sind. So kann schon ermittelt werden ob sich der Keimtubulus im frühen, mittleren oder späten Stadium der Spermatogenese befindet. Analog wird mit dem Fragebogen fortgefahren. Typ-A-Spermatogonien (A) intermediate Spermatogonien (In), Typ-B-Spermatogonien (B), präleptotäne Spermatozyten (Pl), leptotäne Spermatozyten (L), zygoten Spermatozyten (Z), pachytäne Spermatozyten (P), diplotäne Spermatozyten (D), primäre/sekundäre Spermatozyten während der Meiose (Mi), Spermatiden (step 1 – 16)(Meistrich et al., 2013).

B Repräsentative Auswahl an RT-PCRs für Marker von verschiedenen Keimzellen an juveniler muriner Testes

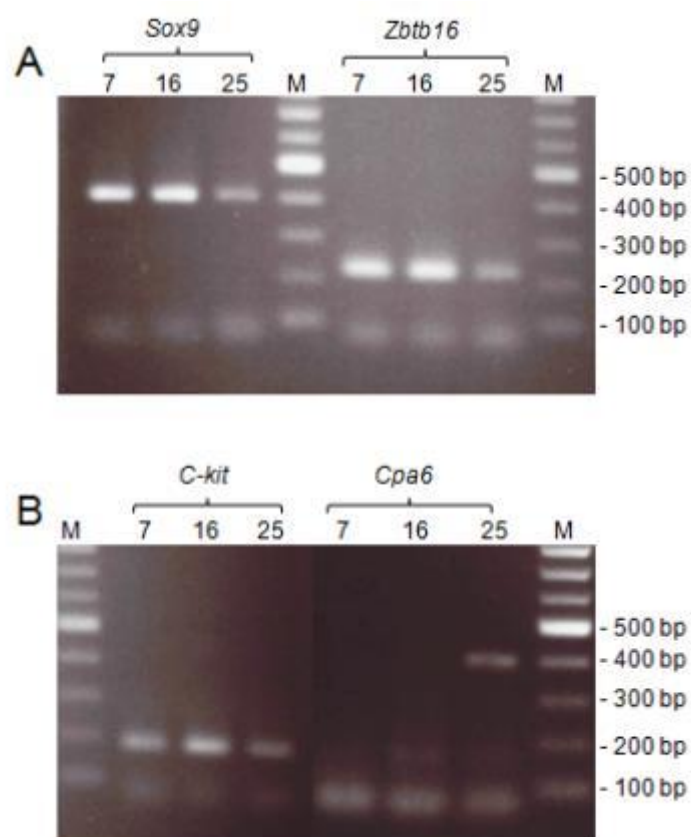


Abbildung 26: Repräsentative Auswahl an RT-PCRs für Marker von verschiedenen Keimzellen an murinen Testes unterschiedlichen Alters

(A) RT-PCR mit spezifischen Primer zum Nachweis von Sertoli-Zellen (*Sox9*) und undifferenzierte Spermatogonien (*Zbtb16*) (da Silva *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 2008). Verwendet wurde gesamt RNA aus murinen Testes im Alter von 7 (7), 16 (16) und 25 (25) dpp. Die Transkripte für *Sox9* (407 bp) und *Zbtb16* (221 bp) sind in allen Altersstufen nachweisbar. (B) RT-PCR mit spezifischen Primer für differenzierte Spermatogonien (*C-Kit*) und frühe/runde Spermatiden (*Cpa6*) an gesamt RNA aus murinen Testes im Alter von 7, 16 und 25 dpp (Cheng *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2008). Für *C-Kit* ist ein Amplifikat von 232 bp in allen 3 Tieren amplifiziert worden. *Cpa6* (417 bp) ist nur in 25 dpp Mäusen detektierbar. Als Marker wurde 2log DNA Ladder verwendet.

C Immunmarkierung an murinen Testes im Alter von 7 dpp, 16 dpp, 25 dpp und 12 Wochen (Adult) mit spezifischen Antikörper gegen AKTIN

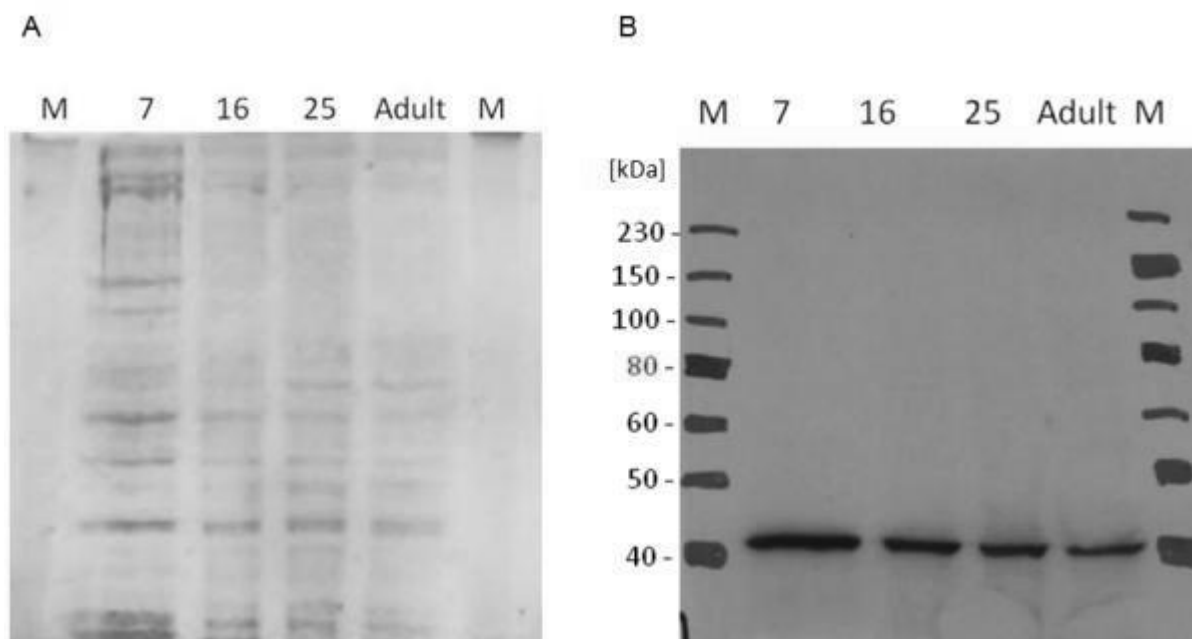


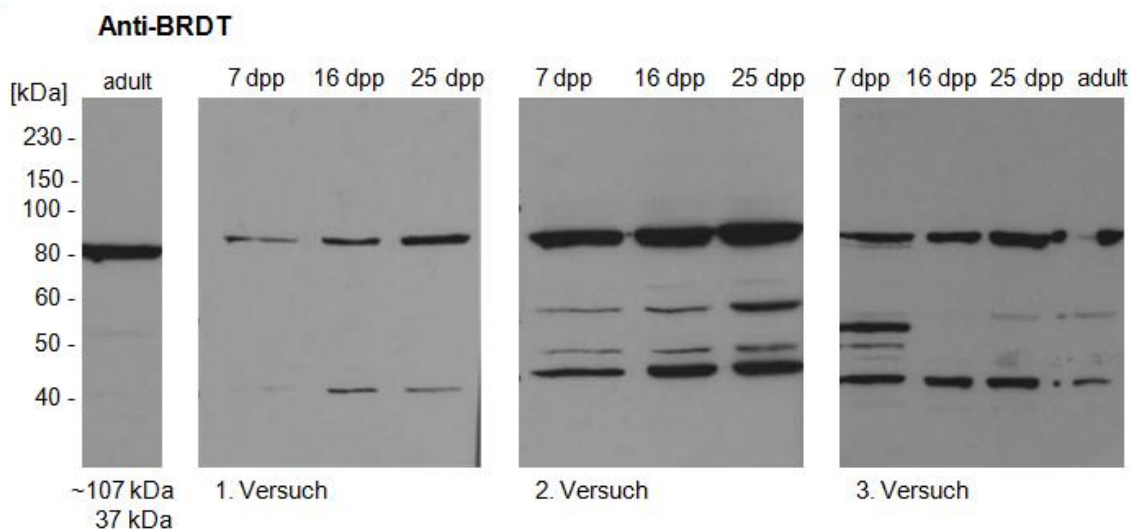
Abbildung 27: Coomassie-Färbung und Immunmarkierung eines 10 % SDS-Gels mit spezifischem Antikörper gegen AKTIN.

(A) Coomassie-Färbung eines 10% SDS-Gels, mit je 50 µg gesamt Proteinextrakt aus 7 dpp, 16 dpp, 25 dpp und Adultem (12 Wochen) murinem Testis, nach der elektrophoretischen Übertragung auf eine Nitrozellulosemembran. Um die Effizienz des elektrophoretischen Transfers zu überprüfen wurde nach dem Blotten, das SDS-Gel für ca. 2 h in Coomassie-Färbelösung gefärbt und für weitere 2 - 3 h mit Coomassie-Entfärber wieder entfärbt um die verbliebenen Proteinbanden auf dem SDS-Gel zu visualisieren. Zum einem kann so überprüft werden, dass wirklich Protein in dem aufgetragenen Proteinextrakt enthalten war, zum anderen kann visuell nachvollzogen werden wie viel des Proteinextraktes nach dem Blotten noch auf dem SDS-Gel verblieben ist.

(B) Aktin (1:2000) wurde stets als positiv Kontrolle verwendet und konnte als Signal in der Höhe von ~42 kDa im gesamt Proteinextrakt von Testes aller Alter (7 dpp (7), 16 dpp (16), 25 dpp (25) und Adultem (12 Wochen)) detektiert werden. Belichtungszeit 2 - 3 Sek. Als Marker wurde der Color Plus™ Prestained Ladder von NEB verwendet.

D Immunmarkierung gegen BRDT an murinen Testes im Alter von 7 dpp, 16 dpp, 25 dpp

A



B

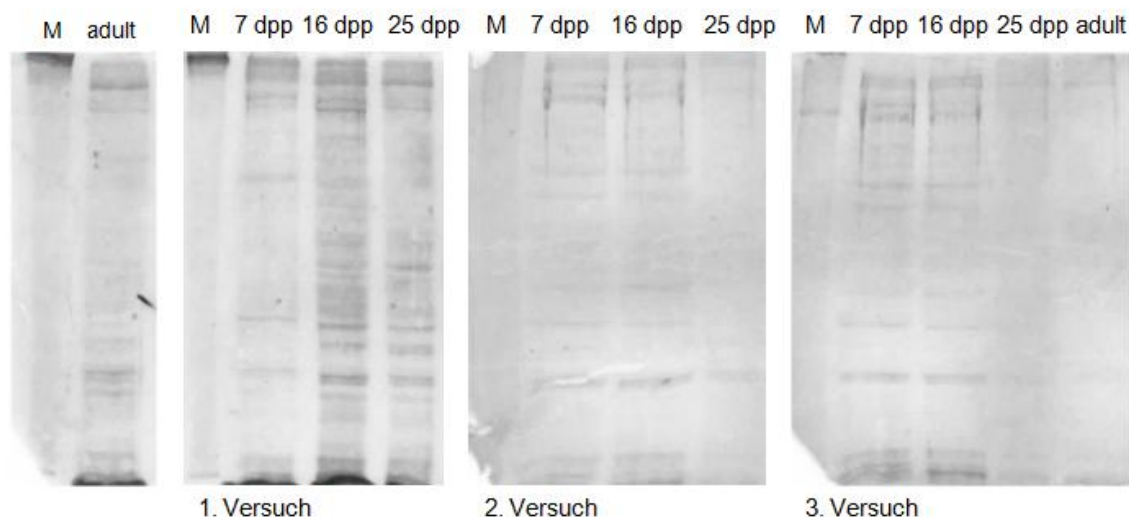


Abbildung 28: Immunoblots gegen BRDT zeigen immer eine unterschiedliche Signalverteilung

(A) Immunoblots mit einer Markierung gegen BRDT an Gesamtproteinextrakt aus murinem Testes im Alter von 7, 16, 25 dpp und 12. Wochen (adult). In drei aufeinander Folgenden Versuchen konnte die Signalverteilung aus den Vorversuchen an adultem Proteinextrakt nicht wiederholt werden. BRDT besitzt zwei vorhergesagte Isoformen der Größe von ~37 kDa und ~107 kDa. In allen Immunoblots konnten deutliche Signale der Größe von ~80 kDa und ~40 kDa detektiert werden. Bei diesen Signalen könnte es sich um die beide vorhergesagten Isoformen handeln. Zudem konnten weitere Signale detektiert werden, die nicht replizierbar sind. (B) Coomassie-Färbung der 10 % SDS-Gele nach dem Blotten. Geplottet wurde jeweils über Nacht bei 40 V und 4 °C. Aufgetragen wurden jeweils 50 µg Gesamtproteinextrakt aus 7, 16, 25 dpp und adultem murinem Testis. Erkennbar ist, dass die Verteilung der Proteinbanden zwischen den einzelnen Versuchen in ihrer Intensität variiert weshalb vermutet wird, dass der Blottvorgang nicht optimal verlief.

12 Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

„Die Testis spezifische Expression von Bromodomänen-Proteinen und Untereinheiten des Polycomb-Repressiven-Komplexes sowie deren mögliche Funktionen während der Spermatogenese in *Mammalia*“

unter der Leitung von Frau Dr. Christina Rathke (Fachbereich Biologie, Philipps-Universität Marburg) selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich angegebenen Quellen und Hilfen bedient habe. Die vorliegende Dissertation wurde in ihrer jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den

Nicola Helena Gonzalez

13 Danksagung

Zuerst möchte ich mich von Herzen bei Dr. Christina Rathke für die Übernahme des Erstgutachtens, für die gute Betreuung sowie ihre Geduld bedanken. Zudem Danke ich ihr, dass sie immer ein offenes Ohr für mich hatte und ich mich ihr in allen Lebenslagen anvertrauen konnte.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Renate Renkawitz-Pohl für die Übernahme des Zweitgutachtens, sowie dafür, dass sie mir die Möglichkeit gab in den Räumlichkeiten ihrer Arbeitsgruppe zu promovieren.

Zudem Danke ich Prof. Dr. Uwe G. Maier und Prof. Dr. Uwe Homberg, dass sie sich die Zeit nehmen und Teil meiner Prüfungskommission sind.

Der "KFO 181/2 Mechanisms of male factor infertility" möchte ich für die Finanzierung meines Projekts danken.

Marek Bartkuhn danke ich für seine Unterstützung in allen Angelegenheiten die sich mit der qPCR befassen.

Auch möchte ich Katja, Ina, Jessi und Alexandra ganz herzlich für das Korrekturlesen dieser Arbeit danken. Ich weiß wie viel Zeit und Mühe das Kostet, nochmal 1000 Dank.

Vor allem bei meinen Kolleginnen Lisa und Zeynep möchte ich mich bedanken, die beruflich und privat immer für mich da waren. Ohne sie wäre meine Promotionsphase bei weitem nicht so schön gewesen.

Katja danke ich für ihre Hilfe bei allen anfallenden PC-Problemen, bei der Bestellung von besonderem Laborbedarf, für das Korrekturlesen und für die sportlichen Ausflüge in die Natur.

Ruth und Detlev möchte ich für ihre freundliche Hilfsbereitschaft bei allen anfallenden Fragen und Problemen des Laboralltags danken.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Rathke/Renkawitz-Pohl und Önel bedanken, die mir steht's weiter geholfen haben sowie für die offene und angenehme Arbeitsatmosphäre. Besonders danke ich Christiane Rohrbach für Unterstützung bei den Westernblot-Analysen als auch bei der Immunhistologie.

Auch bei dir Patrick möchte ich mich von Herzen bedanken, dass du mich immer wieder aufgemuntert hast wenn es mit dem Schreiben nicht so gut lief. Ich weiß nicht wie ich diese Phase ohne Dich überstanden hätte.

Zu Letzt möchte ich meinen Eltern Danken, die mich all die Jahre unermüdlich unterstützt haben und es geschafft haben mich so zu erziehen, das aus mir „was geworden ist“.